UNTERSUCHUNG DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI K - 12 MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

KLEMENS KOMISCHKE

aus Berlin-Spandau

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNTERSUCHUNG DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI K-12 MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

KLEMENS KOMISCHKE

aus Berlin-Spandau

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	20. Januar 1984
Dekan:	Professor Dr. Erwin Kulzer
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Volkmar Braun
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Klaus Hantke

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Volkmar Braun angefertigt.

Herrn Professor Braun danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. Klaus Hantke, Herrn Dr. Knut Heller und Herrn Dr. Eckhard Fischer für die vielen Anregungen und Hilfen, die ich in Diskussionen mit ihnen erhielt.

Meinem Laborkollegen Herrn Nikolaos Dimoudis danke ich für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der beiden Mikrobiologie-Lehrstühle für ihre Hilfsbereitschaft und für das gute Arbeitsklima.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0065

Meinen Eltern

Emmi und Hubert Komischke

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Material	7
2.1.1.	Chemikalien	7
2.1.2.	Zellkulturmaterial	8
2.1.3.	Puffer und Medien	8
2.1.3.1.	Puffer	8
2.1.3.2.	Medien	9
2.1.3.3.	Zellkulturmedien	10
2.1.4.	Organismen	11
2.2.	Methoden	12
2.2.1.	Ethanolfällung	12
2.2.2.	Acetonfällung	12
2.2.3.	Proteinbestimmung nach der "Fluram"-Methode	12
2.2.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.2.5.	Anfärben der Polyacrylamid-Gele	14
2.2.6.	Anzucht von Bakterien	14
2.2.7.	Isolierung der äußeren Membran von Escherichia coli	14
2.2.8.	Herstellung eines Phagenlysats auf Platten	15
2.2.9.	Bestimmung des Phagentiters	15
2.2.10.	Überprüfung der Phagensensitivität	15
2.2.11.	Bestimmung des Colicin-Titers	15
	Zellkulturmethoden	15
2.2.12.	Kultivierung von Myeloma- und Hybridomazellen	16
2.2.13.	Bestimmung der Lebendzellzahl	16
2.2.14.	Einfrieren von Zellinien	16
2.2.15.	Auftauen von Zellinien	16
2.2.16.	Immunisierung der Mäuse	17
2.2.17.	Fusion	17
2.2.17.1.	Fusionsmechanismus und Selektion der Hybridzellen	17
2.2.17.2.	Bereitung der Milzzellensuspension	18
2.2.17.3.	Bereitung der Myelomazellensuspension	18
2.2.17.4.	Fusion	18
2.2.18.	Subklonierung	19
2.2.18.1.	Klonieren in Weichagar	19
2.2.18.2.	Klonieren in Flüssigkultur	20
2.2.19.	Jodierung von Immunglobulinen	20
2.2.20.	Isolierung von Immunglobulinen durch Natriumsulfatfällung	21
2.2.21.	Kopplung von Peroxidase an Immunglobuline	21
2.2.22.	Affinitätsreinigung der zweiten Antikörper	22
2.2.23.	Enzymimmunassay	22
2.2.24.	Radioimmunassay	23
2.2.25.	Enzymimmunassay zur Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen	24
2.2.26.1.	Protein-Blotting	25
2.2.26.2.	Immunologischer Nachweis geblotteter Proteine	26
2.2.27.	Affinitätsreinigung von Antikörpern mit Hilfe eines Protein-Blots	27
2.2.28.	Isolierung von monoklonalen Antikörpern über Protein A-Sepharose	27
2.2.29.	Gewinnung von Fab-Fragmenten	28
2.2.30.	Agglutinationstest mit Bakterien	29

		Seite
2.2.31.	Bestimmung der Phagenadsorption	29
2.2.32.	Kinetik der Phagenadsorption	30
2.2.33.	Colicin M-Test	31
2.2.34.	Immunpräzipitation (Version 1)	32
2.2.35.	Immunpräzipitation (Version 2)	32
3.	Ergebnisse	35
3.1.	Hybridomalinie D141	35
3.1.1.	Immunisierung	35
3.1.2.	Fusion	35
3.1.3.	Subklonierungen	36
3.1.4.	Enzymimmunassay	36
3.1.5.	Bestimmung der Subklassen	36
3.1.6.	Agglutinationstest	36
3.1.7.	Bestimmung der T5-Phagenadsorption	37
3.1.8.	Bestimmung der BF23-Phagenadsorption	38
3.1.9.	Colicin M-Test	39
3.1.10.	Colicin B-Test	39
3.1.11.	Blotting	40
3.2.	Hybridomalinie K53	41
3.2.1.	Immunisierung	41
3.2.2.	Fusion	41
3.2.3.	Agglutinationstest	42
3.2.4.	Subklonierungen	42
3.2.5.	Bestimmung der Subklassen	42
3.2.6.	Immunpräzipitation	42
3.2.7.	Agglutinationstest mit dem Stamm PL 6	43
3.2.8.	TuII*-Phagenbindungstest	44
3.2.9.	K3-Phagenbindungstest	44
3.3.	Hybridomalinie AJ235	45
3.3.1.	Immunisierung	45
3.3.2.	Fusion	45
3.3.3.	Screening	46
3.3.4.	Subklonierungen	46
3.3.5.	Bestimmung der Subklassen	47
3.3.6.	Enzymimmunassay mit Membranproteinen des Stammes H 1426 und Lipopolysaccharid aus Escherichia coli K-12	47
3.3.7.	Agglutinationstest	48
3.3.8.	Enzymimmunassay mit Bakterien	50
3.3.9.	Isolierung der AJ235-Antikörper	51
3.3.10.	Charakterisierung der isolierten AJ235-Antikörper	51
3.3.11.	Gewinnung von Fab-Fragmenten aus AJ235-Antikörpern	52
3.3.12.	Blotting mit AJ235-Antikörpern	53
3.3.13.	Blotting mit Fab-Fragmenten der AJ235-Antikörper	54
3.3.14.	Blotting mit Peroxidase-konjugierten AJ235-Antikörpern	55
3.3.15.	Blotting mit affinitätsgereinigten AJ235-Antikörpern	55
3.3.16.	Immunpräzipitation	56
3.3.17.	Kinetik der T5-Phagenadsorption (Stamm W 3110)	57
3.3.18.	Kinetik der T5-Phagenadsorption (Stamm HO 831)	59
3.3.19.	Kinetik der T2-Phagenadsorption (Stamm H 315)	60
3.3.20.	Kinetik der T2-Phagenadsorption (Stamm 1024)	61
3.3.21.	Kinetik der T6-Phagenasdorption (Stamm W 3110)	62
3.3.22.	Kinetik der T6-Phagenadsorption (Stamm 72-6)	63
3.3.23.	Kinetik der TuIb-Phagenadsorption (Stamm W 3110)	64

		Seite
3.3.24.	Kinetik der TuIb-Phagenadsorption (Stamm 72-6)	64
3.3.25.	Kinetik der T1-Phagenadsorption (Stamm HO 831)	65
3.3.26.	Kinetik der ø80-Phagenadsorption (Stamm HO 831)	66
3.3.27.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Phagenadsorptionskinetiken	67
3.3.28.	Colicin M-Test (Stamm W 3110)	68
3.3.29.	Colicin B-Test (Stamm W 3110)	69
4.	Diskussion	72
4.1.	Hybridomalinie D141	72
4.2.	Hybridomalinie K53	74
4.3.	Hybridomalinie AJ235	76
4.4.	Immunoblotting	80
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literatur	84

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Amino-di(3-ethyl-benzthiazolin Sulfonsäure-6)Ammoniumsalz
Ak	Antikörper
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
cpm	(gemessene) Zerfälle pro Minute
d	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ention.	entionisiert
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Ig	Immunglobulin
k	Kilo..
Min.	Minute(n)
OD	optische Dichte
OM	äußere Membran
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBS/Triton	PBS mit 0,1% Triton X-100
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde(n)
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

Das Bakterium Escherichia coli ist weitverbreitet als Bestandteil der Darmflora vieler Spezies und auch des Menschen. Im menschlichen Darm beträgt sein Anteil allerdings weniger als ein Prozent. Das Bakterium, im Darm meist harmlos, ist die Hauptursache menschlicher Harntraktsinfektionen. Im Darm können enteropathogene Escherichia coli-Stämme zu Diarrhöen führen. Diese Stämme sind oft die Ursache von Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern und Fernreisenden. Viele Lebensmittelvergiftungen lassen sich ebenfalls auf Escherichia coli-Infektionen zurückführen.

Viehzüchter klagen über durch Escherichia coli K-88 verursachte, oft tödlich verlaufende Diarrhöen ihrer Ferkel oder durch Escherichia coli K-99 verursachte Infektionen ihrer Kälber (57).

Im Labor beschäftigen sich die meisten Wissenschaftler mit den nicht pathogenen Escherichia coli K-12-Stämmen. Diese Stämme lassen sich leicht kultivieren. Ihre Generationszeit ist kurz, unter optimalen Bedingungen beträgt sie zwanzig Minuten. Es ist also möglich innerhalb kurzer Zeit, ausgehend von einer Kolonie, eine große Menge Zellen anzuziehen.

Für die Klonierung von Genen verschiedenster Organismen hat Escherichia coli, sozusagen als "Werkzeug", eine große Bedeutung gewonnen.

Der entscheidende Grund für die Beschäftigung mit dem Bakterium Escherichia coli liegt in seinem Modellcharakter für andere Organismen.

Durch die kurze Generationszeit können genetische Mutationen sehr schnell ausgeprägt werden. Dadurch ist es in sehr vielen Fällen möglich, phänotypische Veränderungen (Ausfall bestimmter Funktionen, Ausfall von Proteinen) mit genotypischen Veränderungen zu korrelieren.

Bisher sind mehr als Tausend Gene von Escherichia coli K-12 kartiert (2), das ist etwa ein Fünftel des gesamten Genoms. Über 160 Proteine konnten eindeutig einem Gen zugeordnet werden (68). Damit ist Escherichia coli der bestuntersuchte Organismus.

Es ist also gerade am Beispiel Escherichia coli möglich, Einblicke in den Zusammenhang Gen - Struktur (Protein) - Funktion zu erhalten.

Die Funktionen eines Bakteriums sind aufgrund seines ständigen Kontaktes mit seiner Umwelt sehr vielfältig. Escherichia coli muß in der Lage sein, sich ständig wechselnden Verhältnissen anzupassen.

Die Zelle ist, wie jede Zelle, von einer Cytoplasmamembran umgeben. Zusätzlich besitzt Escherichia coli, wie alle Gram-negativen Bakterien, eine äußere Membran. Zwischen beiden Membranen befindet sich der periplasmatische Raum mit dem Mureinsacculus.

Die Cytoplasmamembran besteht, wie die Plasmamembranen eukaryontischer Zellen, aus einer Lipiddoppelschicht mit ein- und angelagerten Proteinen. Zu diesen Proteinen gehören die Enzyme der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung, des aktiven Transports und der Biosynthesewege, die zu den Hauptbestandteilen der Membranen führen, den Phospholipiden, dem Lipopolysaccharid, dem Murein und den Kapselpolysacchariden. Die Zusammensetzung der Cytoplasmamembran ist abhängig von äußeren Faktoren, z.B. dem Nährstoffangebot. Viele Proteine können entsprechend den physiologischen Bedingungen induziert werden.

Der periplasmatische Raum kann bis zu vierzig Prozent des gesamten Zellvolumens ausmachen (78). Er enthält verschiedene hydrolytische Enzyme, sowie Bindeproteine von Transportsystemen. Der einschichtige Mureinsacculus ist über kovalente Bindungen mit dem Lipoprotein der äußeren Membran verknüpft (7). Durch den Mureinsacculus wird die Form der Zelle festgelegt.

Die äußere Membran entspricht weitgehend anderen biologischen Membranen. Sie enthält neben Phospholipiden und Glykolipiden einen hohen Proteinanteil von etwa sechzig Gewichtsprozent. In die äußere Doppelschicht der Membran ist Lipopolysaccharid eingelagert. Das Lipopolysaccharid trägt die O-spezifischen Zuckerketten, die den Serotyp des Bakteriums definieren.

Die Phospholipide und das Lipopolysaccharid bilden eine Barriere für hydrophile Substanzen. Diese können allerdings, sofern sie nicht größer als 600 Dalton sind, die äußere Membran durch die Porine passieren. Zu den Porinen gehören die Proteine OmpC (Ib), OmpF (Ia) und unter bestimmten Bedingungen PhoE (60). OmpC und OmpF bilden Trimere (40). Beide kommen in einer Kopienzahl von mehr als 100.000 pro Zelle vor. OmpC wird von den Phagen 434, TuIb,

Mel und PA2 als Rezeptor benötigt. OmpF ist Rezeptor für die Phagen TuIa, T2 und TP1. PhoE ist eine Pore, die besonders die Diffusion von Phosphaten erleichtert. Der Phage TC45 benutzt PhoE als Rezeptor. Diese drei Porine sind sehr nahe miteinander verwandt (66).

Ein weiteres, in hoher Kopienzahl (750.000 pro Zelle) vorkommendes Protein ist das schon erwähnte Lipoprotein, von dem bisher keine Rezeptorfunktionen bekannt sind.

Das OmpA-Protein (II*) zählt mit über 100.000 Kopien pro Zelle ebenfalls zu den Hauptproteinen. Es hat eine wichtige Funktion für die Bildung stabiler Komplexe bei der Konjugation und dient den Phagen TuII* und K3 als Rezeptor.

Neben diesen Proteinen sind eine Vielzahl anderer Proteine mit spezifischen Funktionen in der äußeren Membran enthalten (10,60,70). Diese Proteine treten in einer Zahl von einigen Hundert bis über Zehntausend auf. Ihre Häufigkeit wird vielfach durch Wachstumsbedingungen reguliert.

Das Tsx-Protein dient der Aufnahme von Nukleosiden. Es ist Rezeptor für das Colicin K und den Phagen T6 (53).

Das LamB-Protein erleichtert die Aufnahme von Maltose und Maltodextrinen und ist Rezeptor für den Phagen Lambda (72). Die Kopienzahl pro Zelle kann durch Maltose im Medium um ein Vielfaches gesteigert werden.

Eine sehr wichtige Funktion für die Bakterienzelle haben Rezeptoren für Eisen(III)-Verbindungen. Eisen(III)-Salze sind essentielle Wachtumsfaktoren für Bakterien. Unter aeroben Bedingungen bei pH 7 beträgt die Konzentration an freien Eisen(III)-Kationen nur 10^{-18} M. Die Zelle benötigt zum Wachstum aber 10^{-7} M (8).

Für die Eisenaufnahme gibt es mehrere hochaffine Systeme.

Über den FecA-Rezeptor gelangt ein Eisencitratkomplex in die Zelle. Das Aufnahmesystem, zu dem auch noch ein FecB-Genprodukt gehört, ist in (85) untersucht worden.

Das FepA-Protein ist der Rezeptor für Eisen(III)-Enterochelin. Es ist außerdem Rezeptor für das Colicin B (11,69).

Weiterhin sind die Produkte des fhu-Genbereiches, der inzwischen kloniert wurde (20), für die Eisenversorgung über Ferrichrom, Aerobactin, Coprogen und Rhodothorulasäure notwendig. Von diesen Komplexverbindungen braucht nur

Ferrichrom das FhuA-Genprodukt in der äußeren Membran, das auch Rezeptor für die Phagen T1, T5 und ϕ80, das Colicin M und das dem Ferrichrom strukturanalogen Antibiotikums Albomycin ist (10).

Ungeklärt ist noch weitgehend die Organisation der Rezeptoren in der Membran. Außerdem ist bei multifunktionellen Rezeptoren wie FhuA, FepA, Tsx, LamB etc. unbekannt, wo die einzelnen Funktionen im Protein lokalisiert sind.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieser Fragen besteht in der Untersuchung der Membran- und Rezeptortopologie mit Hilfe von Antikörpern.

Immunologische Untersuchungen der Membranantigene wurden zunächst mit polyklonalen Kaninchenseren durchgeführt. Die Kaninchen wurden mit ganzen Zellen, Präparationen der äußeren Membran oder denaturierten Hauptproteinen immunisiert. Die erhaltenen Antiseren mußten, um monospezifische Antikörper für diese Untersuchungen zu erhalten, voradsorbiert werden. Antiseren gegen denaturierte Proteine reagierten oft nicht mit den nativen Proteinen (16, 37,38).

Ein neuer Ansatz ergab sich mit der Etablierung der Technik der monoklonalen Antikörper (51). Mit dieser Methode ist es prinzipiell möglich, reine Antikörper mit unreinem Antigen zu erhalten. Die Voraussetzung für monospezifische Antikörper ist also nicht mehr die Isolierung des Antigens (19,25,49, 87).

Die Antikörper werden von Hybridzellen produziert, die aus der Fusion einer Myeloma- mit einer Milzzelle einer immunisierten Maus hervorgegangen sind. Durch Klonierung wird sichergestellt, daß alle Hybridzellen von einer Zelle abstammen. Diese Zellen produzieren für potentiell unbegrenzte Zeit alle identische Antikörper. Sie erkennen dieselben Determinanten (etwa 3-6 Aminosäuren, bzw, Zuckerreste) eines Antigens. Man hat also mit diesen Antikörpern, besonders nach ihrer Isolierung über Protein A-Sepharose (27), eine chemisch eindeutig definierte Substanz für Struktur- und Funktionsuntersuchungen.

Die monoklonalen Antikörper haben in weiten Bereichen der Medizin und Biologie Anwendung gefunden. Sie werden zur Krebserkennung und demnächst wohl auch als Immunotoxine zur Krebstherapie eingesetzt (43). Inzwischen wurden Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper mit zwei definierten Anti-

genspezifitäten etabliert (62).

Auch in der Mikrobiologie gibt es inzwischen eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen bakterielle Antigene beschäftigt haben (13,30,35,47).

Die Arbeitsgruppe von Maxime Schwartz untersucht mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern den LamB-Rezeptor (21,22,74). In diesen Arbeiten wurde versucht, unter Anwendung der Gentechnik und mit monoklonalen Antikörpern Rezeptorfunktionen einzelnen Proteindomänen zuzuordnen.

In dieser Arbeit sollte der FhuA-Rezeptor mit monoklonalen Antikörpern untersucht werden. Eine Arbeit über polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen das FhuA-Protein wurde kürzlich veröffentlicht (14).

Mit diesen monoklonalen Antikörpern sollten Informationen über die Organisation des 78 Kilodalton großen Rezeptormoleküls gewonnen werden. Es war bisher nicht bekannt, ob die einzelnen Substrate des Rezeptors (die Phagen T1, T5 und ø80, Colicin M, Ferrichrom und Albomycin) alle eine gemeinsame Bindestelle benutzen oder ob für jedes Substrat eine distinkte Bindestelle vorhanden ist. Es ist bekannt, daß einige Substrate die Bindung eines weiteren Substrats erschweren, z.B. verhindert Ferrichrom die Bindung des ø80-Phagen (86). Es konnte aber keine Aussage gemacht werden, ob dies auf die Benutzung der gleichen Bindungsstelle oder auf Konformationsänderungen zurückzuführen ist. Die Genetik zeigt eng begrenzte, überlappende Rezeptorbereiche (33).

Desweiteren sollte versucht werden, mit monoklonalen Antikörpern Aussagen über Nachbarschaften der Proteine in der äußeren Membran zu machen.

Eine Schwierigkeit für diese Experimente bestand darin, daß bisher nur sehr wenige Proteine der äußeren Membran isoliert werden konnten. Zudem müssen zur Isolierung oft denaturierende Methoden angewandt werden, da diese Proteine fest in der Membran verankert sind. Dies gilt vor allem für das FhuA-Protein, dessen Konzentration zudem noch sehr gering ist.

Die Immunisierungen konnten deshalb nicht mit den reinen Proteinen durchgeführt werden. Da diese natürlich auch nicht für Tests zur Überprüfung der Antikörperproduktion vorhanden waren, wurde versucht, einen anderen Test zur schnellen Bestimmung der Antigenspezifität zu entwickeln.

Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Antigenspezifität von Antikörpern besteht im Immunoblotting (26). Dabei wird die Antigenmischung in der Gelelektrophorese aufgetrennt, auf einen Nitrocellulosefilter übertragen (geblottet) und dieser Blot wird mit den Antikörpern inkubiert. Die Zuordnung der Antikörper zum Antigen erfolgt mittels eines zweiten Antikörpers der radioaktiv oder mit einem Enzym markiert ist.

Dieses Verfahren sollte auch zur Bestimmung der gegen Membranproteine gerichteten monoklonalen Antikörper angewandt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in analysenreiner Qualität bezogen.

Amersham	^{14}C-Aminosäuren, 50 µCi/ml Natrium-^{125}Jodid, 100 mCi/ml
Behringwerke	Antiserum gegen Maus-Gammaglobuline vom Kaninchen Freund'sches Adjuvans komplett Freund'sches Adjuvans inkomplett
Boehringer Mannheim	Desoxyribonuklease Octylglucosid
Difco	Bacto-Agar Bacto-Trypton Hefe-Extrakt Nutrient Broth
Gibco	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 E/ml) RPMI-1640-Medium mit Glutamin und Natriumhydrogencarbonat (1 x) RPMI-1640-Medium, zehnfach konzentriert (10 x)
Hoffmann LaRoche	"Fluram" (Fluorescamin)
Paesel	Fötales Kälberserum (HY-Clone)
Pharmacia	Sephadex G 25 Sephadex G 50 Protein A-Sepharose CL-4B
Research Products	Agarose (High Gelling Temperature)
Serva	Acrylamid Amidoschwarz

Serva	Ammoniumpersulfat Bisacrylamid Bromphenolblau Coomassie Brilliant Blau G-250 Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline (PBS) Fluoresceindiacetat Hypoxanthin ß-Mercaptoethanol Natriumdodecylsulfat (SDS) Rinderserumalbumin (BSA) N,N,N',N'-Tetraethylendiamin (TEMED) Thymidin Triton X-100
Sigma	Aminopterin Glutaraldehyd

2.1.2. Zellkulturmaterial

Becton Dickinson	Falcon-Gewebekulturflaschen, Wachstumsfläche 25 cm^2 und 75 cm^2 Gewebekulturplatten (96 Einzelkulturen)
Costar	Gewebekulturplatten (24 Einzelkulturen)
Cooke	Flexible V-Mikrotiterplatten aus PVC

2.1.3. Puffer und Medien

2.1.3.1. Puffer

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline:

8,0 g Natriumchlorid
0,2 g Kaliumchlorid
0,1 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
0,1 g Calciumchlorid, wasserfrei
1,0 g di-Natriumhydrogenphosphat
0,15 g Natriumdihydrogenphosphat
0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat

auf 1.000 ml bidest. Wasser, der pH-Wert des Puffers war 7,2

M 9-Salzlösung:

60 g di-Natriumhydrogenphosphat
30 g Kaliumdihydrogenphosphat
5 g Natriumchlorid
10 g Ammoniumchlorid

auf 1.000 ml ention. Wasser

Adsorptionspuffer:

10 % M 9-Salzlösung
1,0 mM Magnesiumsulfat
0,5 mM Calciumchlorid
0,01 % Triton X-100

2.1.3.2. Medien

TY-Medium:

8 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g Natriumchlorid

auf 1.000 ml ention. Wasser

Zur Anzucht des Stammes HO 831 wurden 50 µg Neomycin/ml zugesetzt.

NB-Medium:

8 g Nutrient Broth
5 g Natriumchlorid

auf 1.000 ml ention. Wasser

M 9-Medium:

10 % M 9-Salzlösung
1 mM Magnesiumsulfat
1 µg/ml Thiamin
100 µg/ml Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin
40 µg/ml p-Hydoxybenzoesäure, p-Aminobenzoesäure
0,4 % Glukose
1 µM Eisen(III)chlorid

Zur Herstellung von Platten wurden 15 g Bacto-Agar pro 1.000 ml Medium, zur Herstellung von Topagar 6,5 g Bacto-Agar pro 1.000 ml Medium zugesetzt.

2.1.3.3. Zellkulturmedien

Normalmedium:

450 ml RPMI-1640-Medium (1x)
50 ml Fötales Kälberserum
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
5 ml 0,1 M Natriumpyruvat
5 ml 25% Glukose
0,5 ml 5×10^{-2} M ß-Mercaptoethanol

0,5%-Agarosemedium (100 ml):

50 ml 1% Agarose in bidest. Wasser
32,9 ml RPMI-1640-Medium (1x)
5,5 ml RPMI-1640-Medium (10x)
10 ml Fötales Kälberserum
1,0 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
0,1 ml 5×10^{-2} M ß-Mercaptoethanol
0,5 ml 1-Glutaminlösung (30 mg/ml)
1,0 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (100 mg/ml)

HAT-Medium, HT-Medium (49,58):

Es wurden zwei Stammlösungen bereitet:

Stammlösung A war 10^{-2} M an Hypoxanthin (MG 136,1) und $1,6 \times 10^{-3}$ M an Thymidin (MG 242,2).
Dazu wurden 136,1 mg Hypoxanthin und 38,7 mg Thymidin zu 100 ml ention. Wasser gegeben und 1 Std. auf 45-50°C zur Lösung erhitzt.

Stammlösung B war 4×10^{-5} M an Aminopterin (MG 440,4).
1,76 mg Aminopterin wurden zu 90 ml ention. Wasser gegeben. Zur Lösung wurde 0,5 ml 1 N NaOH zugesetzt, mit 0,5 ml 1 N HCl wurde neutralisiert und mit ention. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt.

HAT-Medium: 385 ml RPMI-1640-Medium (1x)
100 ml Fötales Kälberserum
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
5 ml Stammlösung A
5 ml Stammlösung B

HT-Medium: wie HAT-Medium, ohne Stammlösung B

2.1.4. Organismen

Bakterien

Es wurden folgende Escherichia coli K-12 Stämme verwendet:

W 3110	(31)*	Wildtyp
AB 2847	(86)	aroB thi malT tsx
PL 6	(244)	aroB thi malT tsx cir fepA ompA
H 315	(315)	aroB thi malT tsx ompC 434^r
JW 030	(323)	aroB thi fepA cir ompC ompF $phoE^c$
72-6	(395)	malT thi fhuA ompF glpT glpR relA phoA $T2^r$
HO 831	(831)	thr aro leu pro lac gal arg xyl rpsL thi $TuIa^r$ $TuIb^r$ $TuII*^r$ trägt das Plasmid pHK232 (fhuA$^+$ ponB$^+$ $Neomycin^r$)
1024	(1024)	abgeleitet von W3110 fhuA 468::Tn10
H 1426	(1426)	aroB tsx lac rpsL zje::Tn10 fur 79

Außerdem wurde Escherichia coli BS-1 (11)* verwendet.

* Die Zahlen in den Klammern geben die Nummern der Stämme in der Stammsammlung des Lehrstuhls Mikrobiologie II an.

Phagen

Alle verwendeten Phagen stammten aus der Phagensammlung des Lehrstuhls Mikrobiologie II.

Zellinie

Es wurde die P3-NSI-1-Ag4-1 (NS-1)-Zellinie, ein Abkömmling der P3-X63-Ag4-Zellinie eingesetzt. Es handelt sich um eine Zellinie, die aus BALB/c-Mäusen stammt. Sie ist 8-Azaguanin-resistent, ihr fehlt die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und sie produziert nur die leichten kappa-Ketten der Gammaglobuline, die nicht in das Medium abgegeben werden.
Die NS-1-Zellinie wächst bei einer Zelldichte von $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen/ml logarithmisch.
Die Zellinie wurde von der Abteilung Klein des MPI für Biologie in Tübingen zur Verfügung gestellt.

Mäuse

Die verwendeten BALB/c-Mäuse wurden von der Firma Ivanovas (Kißlegg) bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Ethanolfällung

Ein Volumen Proteinlösung wurde mit vier Volumen absolutem Ethanol in der Kälte versetzt. Nach 2 Std. Stehen bei -20°C wurde der Niederschlag in der Kälte abzentrifugiert (20 Min., 5.500 xg). Der Überstand wurde abgesaugt und der Niederschlag mit eiskaltem absoluten Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Niederschlag in Puffer aufgenommen.

2.2.2. Acetonfällung

Ein Volumen Proteinlösung wurde mit drei Volumen Aceton (p.a.) in der Kälte versetzt. Nach 2 Std. Stehen bei -20°C wurde in der Kälte abzentrifugiert (20 Min., 5.500 xg).Der Niederschlag wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Niederschlag in Puffer aufgenommen.

2.2.3. Proteinbestimmung nach der "Fluram"-Methode (80)

Primäre Amine (Lysin) reagieren mit Fluorescamin ("Fluram"). Das Reaktionsprodukt fluoresziert.

Die Fluoreszenz wurde mit einem Photometer (Eppendorf 1101 M) mit Fluoreszenzzusatz (1030) gemessen. Für die Anregungswellenlänge (390 nm) wurde ein Filter mit der Durchlässigkeit 406-430 nm verwendet. Das Anregungslicht wurde zur Fluoreszenzmessung mit einem Filter der Durchlässigkeit 470-3.000 nm ausgefiltert. Das Maximum der Emission liegt bei 475 nm.

Die einzelnen Proben wurden mit Boratpuffer (0,2 M, pH 9,0) auf 1,5 ml aufgefüllt. Unter Schütteln auf dem Vortex-Mischer (Bender & Hobein) wurden 0,5 ml einer Fluram-Lösung zugegeben, die 3 mg Fluram auf 10 ml Dioxan enthielt. Nach 20 Min. wurde die scheinbare Transmission (Fluoreszenz) am Photometer bestimmt. Es wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin erstellt (Bereich: 5-50 µg Protein).

2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (54,59)

Es wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden zwei Stammlösungen bereitet:

Stammlösung A: 44,0 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid wurden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Stammlösung B: 30,0 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid wurden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt. Dazu wurden:

6,25 ml Stammlösung A
5,12 ml bidest. Wasser
12,50 ml Puffer (0,75 M Tris/HCl, pH 8,8)
0,50 ml 10% SDS-Lösung
0,63 ml Ammoniumpersulfatlösung (10 mg/ml, frisch zubereitet)

zusammengegossen und entlüftet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl TEMED eingeleitet.

Nach der Polymerisation (etwa 30-60 Min.) wurde das Gel mit Sammelgellösung überschichtet. Sie wurde so zubereitet:

2,50 ml Stammlösung B
9,13 ml bidest. Wasser
12,50 ml Puffer (0,25 M Tris/HCl, pH 6,8)
0,25 ml 10% SDS-Lösung
0,62 ml Ammoniumpersulfatlösung

wurden zusammengegeben und entlüftet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl TEMED eingeleitet.

Die polymerisierten Gele wurden über Nacht bei 4°C gelagert. Sie wurden mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel gefahren.

Der Elektrodenpuffer setzte sich so zusammen:

0,025 M Tris
0,1925 M Glycin
0,1 % SDS

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 8,3.

Die Proben wurden üblicherweise in folgendem Puffer aufgetragen:

2 Teile Puffer (0,625 M Tris/HCl, pH 6,8)
4 Teile 50% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau
4 Teile 10% SDS
1 Teil ß-Mercaptoethanol

Die zu untersuchende Proteinlösung wurde 1:1 mit diesem Puffer gemischt und entweder für 3-5 Min. auf 100°C oder für 10 Min. auf 70°C erhitzt. Für bestimmte Proben wurde Auftragspuffer ohne ß-Mercaptoethanol eingesetzt, in

dem die Proben nicht erhitzt wurden.

2.2.5. Anfärben der Polyacrylamid-Gele

Die Gele wurden zum Anfärben etwa 2 Std. bei RT in folgende Lösung gelegt:

1,25 g Coomassie Brilliant Blue G-250
in 450 ml 50% Methanol und 50 ml Eisessig

Danach wurden die Gele über Nacht in die Entfärbelösung gelegt:

75 ml Eisessig
50 ml Methanol mit ention. Wasser auf 1.000 ml aufgefüllt.

2.2.6. Anzucht von Bakterien

Eine Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie eines auf seine Marker überprüften Stammes über Nacht unter guter Belüftung bei geeigneter Temperatur (27° oder 37°C) im Reciprocal Waterbath Shaker Model R 76 (New Brunswick Scientific) angezogen. Die Hauptkultur wurde mit dem Volumen Vorkultur angeimpft, das 1% ihres Endvolumens entsprach. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (15 Min., 3.000 xg).

2.2.7. Isolierung der äußeren Membran von Escherichia coli

Die Methode richtet sich nach (75), abgewandelt nach K. Hantke (32).

Die Bakterien wurden in 100 ml Medium bis zur OD 0,5 angezogen und durch Zentrifugation (15 Min., 5.000 xg) geerntet. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und in 0,5 ml Tris/HCL-Puffer (0,2 M, pH 8,0) resuspendiert. Dann wurden nacheinander folgende Lösungen zugegeben:

1 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 M Sucrose
0,1 ml 10 mM EDTA, pH 8,0
0,1 ml Lysozym (2 mg/ml)
3,2 ml ention. Wasser

Nach 5-10 Min. Inkubation bei RT hatten sich Sphäroblasten gebildet. Es wurden 5 ml Extraktionspuffer (2% Triton X-100, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$) und 0,1 ml DNase (1 mg/ml) zugesetzt. Nach guter Durchmischung wurde so lange inkubiert, bis die Lösung nicht mehr viskos war. Es wurde abzentrifugiert (60 Min., 38.000 xg) und zur Entfernung von Triton dreimal mit ention. Wasser gewaschen.
Es schloß sich eine Proteinbestimmung und eine SDS-PAGE an.

2.2.8. Herstellung eines Phagenlysats auf Platten

0,2 ml Bakterien eines sensitiven Stammes (OD 1-2) wurden mit 0,1 ml Phagensuspension (10^7 pfu/ml) gemischt. Die Mischung wurde zu 2,5 ml Topagar gegeben und auf einer TY-Platte verteilt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Topagarschicht in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 ml Puffer (0,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0, 1 mM $CaCl_2$) gut durchmischt. Durch Zentrifugation (15 Min., 3.000 xg) wurden Zelltrümmer und Agar vom Lysat getrennt. Die Phagen wurden über Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

2.2.9. Bestimmung des Phagentiters

Von der Phagenstammlösung wurden verschiedene Verdünnungen in Adsorptionspuffer gemacht. 0,1 ml dieser Verdünnungen wurden zu 2,5 ml Topagar, der mit 0,1 ml eines sensitiven E. coli-Stammes aus der stationären Phase angeimpft war, gegeben, gut durchmischt und auf einer TY-Platte verteilt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.10. Überprüfung der Phagensensitivität

Auf einer TY-Platte wurden die zu überprüfenden Bakterienstämme kreuzweise gegen die Phagen (10^8 pfu/ml) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.11. Bestimmung des Colicin-Titers

0,1 ml der stationären Phase eines für das entsprechende Colicin sensitiven Stammes wurden zu 2,5 ml TY-Topagar gegeben und über TY-Agar ausplattiert. Nach Verfestigung wurden 10 µl-Proben verschiedener Verdünnungen des Colicins aufgetropft. Der Titer entsprach dem reziproken Wert der letzten Verdünnung, die gerade noch einen klaren Lysehof erzeugte.

Zellkulturmethoden

Es wurde grundsätzlich mit sterilen Geräten und Lösungen in der reinen Werkbank gearbeitet.

2.2.12. Kultivierung von Myeloma- und Hybridomazellen

Die Zellen wurden im beschriebenen Medium (RPMI-1640) im feuchten Brutschrank bei 37°C mit 5% CO_2 gehalten.
Je nach Zelldichte wurden die Zellen nach 2-3 Tagen bei RT abzentrifugiert (10 Min., 220 xg). Das Zellsediment wurde so in frischem Medium aufgenommen, daß sich eine Zelldichte von 1-2 x 10^5 Zellen/ml ergab.

2.2.13. Bestimmung der Lebendzellzahl (73)

Dazu wurde folgende Stammlösung hergestellt:

5 mg Fluoresceindiacetat in 1 ml Aceton.

Diese Stammlösung wurde lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Zur Fluorochromierung wurden 5 µl der Stammlösung zu 5 ml PBS gegeben. Diese Lösung wurde 1:1 zur Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer (Assistent) im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Anregungswellenlänge: 490 nm, Fluoreszenz bei 520 nm) gezählt. Lebende Zellen waren intensiv hellgrün gefärbt.

2.2.14. Einfrieren von Zellinien

In ein 2 ml-Röhrchen mit Schraubverschluß (Greiner) wurden 0,1 ml DMSO und 0,3 ml FCS gegeben und eisgekühlt. Die entsprechenden Zellen wurden abzentrifugiert (10 Min., 220 xg) und so in serumfreiem RPMI-1640-Medium aufgenommen, daß sich eine Zelldichte von 1 x 10^7 Zellen/ml ergab. 0,6 ml dieser Zellsuspension wurden in das vorbereitete Röhrchen pipettiert. Nach guter Durchmischung wurden die Zellen zunächst für einige Std. bei -20°C, dann bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.15. Auftauen von Zellinien

Der Inhalt des Röhrchens wurde schnell bei 37°C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Unter Schütteln wurde tropfenweise 4 ml 37°C warmes RPMI-1640-Medium zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 Min., 220 xg), einmal mit Medium gewaschen und zu einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml in Medium aufgenommen. Das Wachstum der Zellen wurde täglich kontrolliert und sie wurden ihrem Zustand entsprechend verdünnt.

2.2.16. Immunisierung der Mäuse

Zur Immunisierung wurden 4-12 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse verwendet. Zur 1. Immunisierung wurde Antigenlösung (1 mg Protein/ml) 1:1 mit kompletten Freund'schen Adjuvans solange ultrabeschallt, bis die Mischung eine gelartige Konsistenz hatte. 50-200 µl dieser Suspension wurden der Maus in die Bauchhöhle injiziert. Zur 2. Immunisierung wurde die gleiche Antigenlösung mit inkompletten Freund'schen Adjuvans ultrabeschallt. Diese 2. intraperitoneale Immunisierung erfolgte mit gleicher Antigendosis 3-4 Wochen nach der ersten.
Für Immunisierungen mit Bakterien wurde der entsprechende Stamm bis zur OD 0,5 angezogen, gewaschen und in PBS suspendiert. 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurden für die 1. Immunisierung mit 0,1 ml kompletten, für die 2. Immunisierung mit 0,1 ml inkompletten Freund'schen Adjuvans zur Abtötung der Bakterien ultrabeschallt. Diese Immunisierungen erfolgten ebenfalls im Abstand von 3-4 Wochen intraperitoneal.

2.2.17. Fusion (19,49)

2.2.17.1. Fusionsmechanismus und Selektion der Hybridzellen

Bei der Fusion werden Milzzellen einer immunisierten Maus mit Myelomazellen unter Einwirkung von Polyethylenglycol verschmolzen. Der Mechanismus der Fusion ist nicht genau bekannt. Man stellt sich vor, daß das PEG in die Membran der Zellen eindringt und dadurch Umstrukturierungen ermöglicht (48).
Bei der Fusion entstehen zunächst Heterokaryons (das sind fusionierte Zellen, bei denen die Zellkerne noch nicht miteinander verschmolzen sind), später dann Hybridzellen.
Diese Hybridzellen zeigen Eigenschaften beider Ausgangszellen. In diesem Fall haben die Hybridzellen die Eigenschaft der Hybridomazellinie, kontinuierlich in Zellkultur zu wachsen und von der Milzzelle die Eigenschaft die Eigenschaft, Antikörper zu bilden.
Die Hybridzellen werden durch HAT-Medium (2.1.3.3.) selektioniert. Das Aminopterin blockiert den Stoffwechselweg, der zu den Desoxyribonukleotiden führt. Für den alternativen Stoffwechselweg wird die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) benötigt. Dieses Enzym fehlt den Myelomazellen. Sie sterben in diesem Medium ab. Isolierte Milzzellen können höchstens zwei Wochen in Zellkultur überleben. Alle länger überlebenden Zellen sollten da-

nach Hybridzellen aus Myeloma- und Milzzellen sein. Dieser Selektionsmechanismus wurde von Littlefield (58) beschrieben.

2.2.17.2. Bereitung der Milzzellensuspension

Die Maus wurde 3-5 Tage nach der letzten Immunisierung durch Eintauchen in eine Chloroform-Atmosphäre getötet. Die Milz wurde steril entnommen, wobei darauf geachtet wurde, sie nicht zu verletzen. Die Milz wurde von anhaftendem Fett- und Bindegewebe befreit, kurz in warmer PBS gewaschen und in eine mit 5 ml PBS gefüllte Petrischale überführt. Die Homogenisierung erfolgte indem die Milz zunächst in kleine Stücke zerteilt wurde und diese dann mehrmals durch eine 5 ml-Pipette gesogen wurden. Das Homogenat wurde in ein mit 5 ml PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Sedimentation größerer Gewebestückchen wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (10 Min., 100 xg). Das Sediment wurde in PBS gewaschen und danach in PBS suspendiert. Die Zellzahl wurde wie beschrieben (2.2.13.) bestimmt.

2.2.17.3. Bereitung der Myelomazellensuspension

Zellen einer NS-1-Kultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden durch Zentrifugation geerntet (10 Min., 220 xg), in PBS gewaschen und in 5 ml PBS suspendiert. Auch hier wurde die Zellzahl bestimmt.

2.2.17.4 Fusion

Pro Fusion wurden zwischen 10^7 und 10^8 Milzzellen und 1-2 x 10^7 Myelomazellen eingesetzt. Das Verhältnis Milz- zu Myelomazellen war zwischen 1:1 und 10:1. Die Zellen wurden zusammen in einem konischen 30 ml-Röhrchen mit Schraubverschluß (Greiner) abzentrifugiert (5 Min., 100 xg, RT). Der Überstand wurde abgesaugt. Zum Sediment wurde unter vorsichtigem Rühren mit der Pipettenspitze 0,5 ml Fusionsreagenz (3 g PEG-2000, 0,3 ml DMSO, 3 ml PBS) gegeben. Damit wurde 90 Sek. bei 37°C inkubiert. Dann wurde tropfenweise unter leichtem Schütteln 10 ml 37°C warme PBS zugegeben. Nach Zentrifugation (5 Min., 100 xg) wurde zum Zellsediment unter leichtem Rühren mit der Pipette 3,6 ml 37°C warmes HAT-Medium gegeben. Von dieser Suspension wurden jeweils 50 µl mit einer Eppendorf-Pipette mit abgeschnittener Spitze auf insgesamt 72 Einzel-

kulturen verteilt, die jeweils 1 ml 37°C warmes HAT-Medium enthielten.

Bei einigen Fusionen wurden Peritoneal-Makrophagen als "feeder"-Zellen eingesetzt. Sie wurden wie folgt präpariert:
Eine etwa 12 Wochen alte BALB/c-Maus wurde durch Eintauchen in eine Chloroform-Atmosphäre getötet. Ihr Bauchfell wurde, ohne es zu verletzen, freigelegt und mit einer 10 ml-Plastikspritze mit einer 21 Gauge-Kanüle wurden 4-5 ml 0,34 M Sucrose-Lösung in den Bauchraum injiziert. Nach vorsichtiger Massage des Bauchraums wurde die Flüssigkeit wieder abgezogen. Die darin enthaltenen Makrophagen ($1\text{-}3 \times 10^6$) wurden abzentrifugiert (10 Min., 220 xg), einmal mit RPMI-1640-Medium gewaschen und in Medium resuspendiert.
Von dieser so bereiteten Makrophagensuspension wurden am Tag vor der Fusion $3\text{-}5 \times 10^4$ Zellen pro Kultur verteilt und in HAT-Medium bei 37°C gehalten.

3-5 Tage nach der Fusion wurde pro Kultur 1 ml frisches HAT-Medium zugegeben. Alle weiteren 3-5 Tage wurde 1 ml Medium gewechselt.

Nach 2-3 Wochen waren die Klone deutlich sichtbar und es konnte auf Antikörperproduktion geprüft werden.

2.2.18. Subklonierung

Es ist unwahrscheinlich, daß die Hybridomalinien, die nach der Fusion erhalten werden, aus einer einzigen Zelle hervorgegangen sind. Es wird sich vielmehr um ein Gemisch verschiedener Hybridomalinien und damit auch ein um ein Gemisch verschiedener Antikörper handeln. Um monoklonale Antikörper zu erhalten, muß man die verschiedenen Zellen durch lokalisiertes Einzelzellwachstum trennen. Das ist mit Hilfe der beiden nachfolgend beschriebenen Methoden möglich.

2.2.18.1. Klonieren in Weichagar (50)

In eine Kunststoff-Petrischale (ø 9 cm, Greiner) wurden 5 ml des 0,5% Agarosemediums (2.1.3.3.) gegeben. Von der zu klonierenden Zellkultur (Zelldichte $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden 1:10, 1:20 und 1:50-Verdünnungen in RPMI-1640-Medium gemacht. 1 ml dieser Verdünnungen wurde mit 1 ml 0,5% Agarosemedium gemischt und auf die verfestigte 0,5% Agarosemediumschicht gegossen. Zur Verfestigung des Agars wurden die Platten noch 10 Min. bei RT stehengelassen. Die Platten wurden wie Zellkulturen inkubiert. Nach 2 Wochen konnten mit

einer Pasteur-Pipette die makroskopisch sichtbaren Einzelzellklone in 1 ml-Suspensionskulturen überführt werden.

2.2.18.2. Klonieren in Flüssigkultur (56,65)

Diese Klonierung wurde in Gewebekulturplatten (Falcon Microtest II, 3040 F) durchgeführt.
Zunächst wurde eine Milzzellensuspension bereitet. Dazu wurde einer durch Eintauchen in eine Chloroform-Atmosphäre getöteten, 6-12 Wochen alten BALB/c-Maus die Milz steril entnommen. Die Milz wurde in einer mit 5 ml PBS gefüllten Petrischale in kleine Stücke zerteilt und durch mehrmaliges Aufziehen in eine 5 ml-Pipette homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein mit 5 ml PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Sedimentation größerer Gewebestücke wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert (10 Min., 100 xg). Das Milzzellensediment wurde mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml in RPMI-1640-Medium aufgenommen. Von dieser Suspension wurden pro Vertiefung der Gewebekulturplatte 100 µl eingesetzt.
Von der zu klonierenden Zellinie wurden Verdünnungen mit 5 Zellen/ml und mit 50 Zellen/ml gemacht. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 100 µl zu den die Milzzellen enthaltenden Vertiefungen gegeben.
Die Milzzellen sind "feeder"-Zellen. Durch sie wird eine das Wachstum begünstigende Zelldichte erreicht. Sie wachsen selbst nicht.
Nach 10 Tagen waren makroskopisch sichtbare Klone entstanden. Aus Vertiefungen, die nur einen Klon enthielten, wurden die Zellen in 1 ml-Kulturen überführt.

2.2.19. Jodierung von Immunglobulinen

Bei der Jodierung wurde nach der Chloramin T-Methode (5,27) verfahren, die nach (44) abgewandelt wurde.
Die Reaktion wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis durchgeführt.
Nacheinander wurden pipettiert:

10 µl 0,25 M Phosphatpuffer, pH 7,5
10 µl einer Lösung von 2 mg Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörpern in 1 ml Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,5)
6 µl = 600 µCi Natrium-125-Jodidlösung (100 mCi/ml, Amersham)
10 µl Chloramin T-Lösung (5 mg/ml in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5)

für 20 Min. wurde gerührt und dann unter Rühren:

100 µl Natriummetabisulfitlösung (1,2 mg/ml in PBS mit 0,1% BSA)

20 µl Tyrosinlösung (0,4 mg/ml in PBS)

dazupipettiert.

Dieses Reaktionsgemisch wurde auf eine Sephadex G 25-Säule aufgetragen. Die Säule hatte ein Volumen von 10 ml. Als Puffer wurde PBS mit 0,1% BSA verwendet. Die Laufgeschwindigkeit betrug 10 ml/Std. Die Fraktionsgröße war 0,3 ml. Mit einem Molekulargewicht von 150 kd liefen die jodierten Immunglobuline im Ausschlußvolumen. 5 µl der einzelnen Fraktionen wurden im Gamma-Scintillationszähler (Beckman Gamma 310 System) gezählt. Die Immunglobulinfraktionen wurden vereinigt und bei -20°C eingefroren.

2.2.20. Isolierung von Immunglobulinen durch Natriumsulfatfällung (61)

Die Antikörper enthaltende Lösung (z.B. Hybridomakulturüberstand) wurde 1:1 mit einer 32% Natriumsulfatlösung (32 g Natriumsulfat in 100 ml ention. Wasser) gemischt und für 1 Std. bei RT unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugation (20 Min., 5.000 xg) wurde das die Immunglobuline enthaltende Sediment zweimal mit 16% Natriumsulfatlösung gewaschen. Der Niederschlag wurde in wenig Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 3 mM Natriumazid) aufgenommen und ausgiebig gegen diesen Puffer bei 4°C dialysiert. Die dialysierten Immunglobuline wurden zur Konjugation mit Peroxidase oder für Tests eingesetzt.

2.2.21. Kopplung von Peroxidase an Immunglobuline (1,18)

3 mg Peroxidase (Boehringer, Grad I) wurden mit 0,1% Glutaraldehyd in PBS versetzt und für 16 Std. bei RT inkubiert. Es wurde mit Carbonatpuffer (0,1 M, pH 9,2) auf 1 ml aufgefüllt und für 30 Std. bei 4°C und mehrmaligem Pufferwechsel im Eppendorf-Reaktionsgefäß gegen 500 ml desselben Puffers dialysiert.

Dazu wurden 1,5 mg (Volumen 0,25 ml) gereinigte Immunglobuline gegeben. Die Immunglobuline waren zuvor ausgiebig gegen den Carbonatpuffer dialysiert worden. Es wurde 16 Std. bei RT gerührt, dann 0,1 ml 0,2 M Lysin zugesetzt und noch 1 Std. unter Rühren inkubiert. Dadurch wurden die freien Carbonylfunktionen des Glutaraldehyds abgesättigt.

Die Peroxidase-konjugierten Antikörper wurden so für den Enzymimmunassay und

das Blotting eingesetzt.

2.2.22. Affinitätsreinigung der zweiten Antikörper

Da in den für den Enzymimmunassay und für das Blotting eingesetzten zweiten Antikörpern (Peroxidase-konjugierte Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörper) häufig Antikörper mit einer Spezifität für E. coli-Proteine enthalten waren, mußten diese Antikörper durch Adsorption an E. coli-Zellen entfernt werden.

Dazu wurde ein entsprechender E. coli-Stamm (meist AB 2847) zur OD 0,5 angezogen, gewaschen und zur OD 5,0 in PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde viermal für 30 Sek. ultrabeschallt. Dann wurde sie 1:1 mit der entsprechenden Antikörperlösung gemischt und für 4 Std. bei RT inkubiert. Im Überstand nach der Zentrifugation (5 Min., 7.000 xg) waren die nicht an E. coli-Proteine gebundenen Antikörper gegen Mausimmunglobuline enthalten.

2.2.23. Enzymimmunassay (12,18,84)

Dieser Test wurde sowohl zum Nachweis der Antikörperproduktion von Hybridomazellinien, als auch zur Charakterisierung der Antigenspezifität (z.B. mit ganzen Bakterien) eingesetzt.

Für den Test wurden flexible PVC-Mikrotiterplatten mit V-förmiger Vertiefung der Firma Dynatech (Virginia, USA) eingesetzt.

Schritt 1: Beschichten der Platten

Methode 1: Beschichten mit Proteinen

Lösliche Proteine wurden zu 2 µg/ml, Membranproteine zu 20 µg/ml in Beschichtungspuffer (0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6) aufgenommen. Pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl eingesetzt. Damit wurde für 16 Std. bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Methode 2: Beschichten mit ganzen Bakterien (67)

Die entsprechenden Bakterien wurden nach 2.2.6. angezogen, in PBS zweimal gewaschen und zu einer OD 0,6 in PBS resuspendiert. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 µl der Suspension gegeben und die Platten bei 4°C für 5 Min. bei 1.500 xg zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µl 0,25% Glutaraldehyd in PBS wurde 5 Min. auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abgegossen

und die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde 1 Std. bei 37°C mit 0,1% Natriumazid in PBS inkubiert. Es schloß sich ein dreimaliges Waschen mit PBS an.

Schritt 2: Hemmung mit Rinderserumalbumin

Zur Absättigung der freien Proteinbindungskapazität der PVC-Platten wurde für 2 Std. mit 200 µl/Vertiefung einer 1% BSA-Lösung in PBS bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Schritt 3: Inkubation mit dem ersten Antikörper

Pro Vertiefung wurden 5-50 µl Kulturüberstand einer Hybridomalinie, bzw. eine geeignete Verdünnung eines Mäuseserums gegeben. Mit Puffer (0,05 M Tris/HCl, pH 8,0) wurde auf 100 µl aufgefüllt und für 3-4 Std. bei 37°C inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS/Triton gewaschen.

Schritt 4: Inkubation mit dem zweiten Antikörper

In jede Vertiefung wurden 100 µl einer geeigneten Verdünnung eines Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörpers gegeben. Damit wurde für 8-16 Std. bei RT inkubiert. Es wurde viermal mit PBS/Triton gewaschen.

Schritt 5: Substratinkubation

8 mg 5-Aminosalicylsäure (Sigma) wurden bei 80°C in 10 ml Acetatpuffer (0,05 M, pH 5,0) gelöst. Nach Abkühlung wurden 10 µl 30% H_2O_2 zugesetzt und von dieser Substratlösung 100 µl pro Vertiefung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 15-30 Min. bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 N NaOH gestoppt. Eine Auswertung erfolgte entweder qualitativ oder durch Messung der Extinktion bei 450 nm im Titertek-ELISA-Reader (Flow).

2.2.24. Radioimmunassay (49,83)

Der Test war in den Schritten 1-3 mit dem Enzymimmunassay identisch.

Schritt 4: Inkubation mit dem zweiten Antikörper

In jede Vertiefung wurden 100 µl Jod-125-markierte Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörper mit einer Aktivität von 10^5 cpm gegeben. Damit wurde 8-16 Std.

bei RT inkubiert. Die Radioaktivität wurde abgesaugt und es wurde viermal mit PBS/Triton gewaschen.

Schritt 5: Schneiden und Zählen

Die Mikrotiterplatten wurden geschnitten und die Radioaktivität der einzelnen Vertiefungen im Gamma-Scintillationszähler bestimmt.

2.2.25. Enzymimmunassay zur Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen

Zur Bestimmung der Subklassen der in den Überständen der Hybridomalinien enthaltenden Immunglobuline wurde ein "MonoAB-ID EIA Kit" von Zymed Lab. (San Francisco, USA) verwendet. In diesem Test waren Kaninchen-Antikörper gegen folgende Maus-Immunglobuline enthalten: IgA, IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgM sowie kappa-leichte Kette und lambda-leichte Kette.

Schritt 1

Flexible PVC-Mikrotiterplatten (Dynatech) wurden mit 100 µl Hybridomakulturüberstand und 50 µl Carbonatpuffer (0,05 M, pH 9,6), bzw. mit 150 µl einer entsprechenden Verdünnung von isolierten Antikörpern in Carbonatpuffer für 16 Std. bei RT beschichtet. (Positive Kontrolle: Beschichtung mit 1:100 verdünnten Mäuseserum).

Schritt 2

Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurde mit 200 µl 0,1% Natriumazid und 1% BSA in PBS für 2 Std. bei 37°C zur Inaktivierung von eventuell in den Überständen enthaltener Peroxidase und zur Absättigung freier Proteinbindungskapazität inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS/Triton gewaschen.

Schritt 3

Pro Vertiefung wurde mit jeweils 50 µl der entsprechenden Subklassen-spezifischen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Kontrolle: 50 µl normales Mäuseserum) für 2 Std. bei RT inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS/Triton gewaschen.

Schritt 4

Inkubation mit 50 µl/Vertiefung Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper für 16 Std. bei RT. Es wurde viermal mit PBS/Triton gewaschen.

Schritt 5

Von der Substratlösung (1 mM ABTS, 0,1 M Natriumcitrat, pH 4,2, 0,03% H_2O_2) wurden pro Vertiefung 100 µl eingesetzt. Nach 15-30 Min. bei RT entwickelte sich in den positiven Vertiefungen eine grüne Farbe. Der Test wurde qualitativ ausgewertet.

2.2.26.1 Protein-Blotting (26)

Unter Protein-Blotting versteht man den Transfer von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinmischungen auf verschiedene Materialien (Nitrocellulose, Celluloseacetat, Diazobenzyloxymethyl-Papier etc.).

Methode 1 (6)

Diese Methode lehnt sich an die von Southern (77) für den Transfer von DNA entwickelte an.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel gründlich mit ention. Wasser gespült. Ein 3MM-Filterpapier (Whatman) wurde auf eine Glasplatte gelegt, die sich auf einer Mikrotiterplatte o.ä. in einer mit Puffer (0,1 M Tris, 0,77 M Glycin) bis zum unteren Rand der Glasplatte gefüllten Wanne befand. Das Filterpapier war breiter als das Gel und tauchte zu beiden Seiten der Glasplatte in den Puffer ein. Auf das Filterpapier wurde das Gel luftblasenfrei gelegt. Darauf folgte die Nitrocellulose-Membran (BA 85, Schleicher & Schüll), die etwas kleiner als das Gel war und zuvor in ention. Wasser eingeweicht wurde. Darauf wurden zwei mit ention. Wasser angefeuchtete Lagen 3MM-Filterpapier und ein trockenes Filterpapier gelegt. Es schlossen sich mehrere Lagen saugfähiges Papier (z.B. Papierhandtücher) und eine Glasplatte, die mit einem 1 kg schweren Gewicht belastet wurde, an. Der Aufbau wurde abgedeckt für mindestens 24 Std. bei RT stehengelassen.

Methode 2: Elektrophoretisches Blotting (79)

Es wurde eine "Trans-Blot-Cell"-Apparatur von Bio-Rad verwendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz mit ention. Wasser gespült und für mindestens 30 Min. zusammen mit der Nitrocellulose-Membran und 3MM-Filterpapier in Puffer (0,025 M Tris, 0,1925 M Glycin, 20% Methanol) inkubiert.

Auf ein Kunststoffgitter wurden eine Scotch-Brite-Matte (angefeuchtet in obigen Puffer) und darauf drei Lagen 3MM-Papier gelegt. Das Gel bildete

die nächste Schicht, auf das die Nitrocellulose-Membran fest angerieben wurde. Es folgte noch ein 3MM-Papier, eine Scotch-Brite-Matte und ein Kunststoffgitter. Die Lagen wurden mit Gummibändern fixiert und so in eine mit obigem Puffer gefüllte Blotting-Zelle überführt, daß die Nitrocellulose-Membran der Anode zugewandt war. Für mindestens 3 Std. wurde eine Spannung von 36 V (etwa 0,2 A in diesem Puffer) angelegt. Das Blotting wurde bei 4°C durchgeführt.

Anfärben der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran

Die Streifen wurden für mindestens 10 Min. mit 0,05% Amidoschwarz in 7% wäßriger Essigsäure gefärbt.
In 7% wäßriger Essigsäure wurde entfärbt. Bei mehrmaligen Wechsel reichten 60 Min. zur Entfärbung aus.

2.2.26.2. Immunologischer Nachweis geblotteter Proteine

Schritt 1

Nach dem Transfer der Proteine wurden die freien Bindungsstellen der Nitrocellulose durch Inkubation mit 1% BSA in PBS, bzw. 10% FCS in PBS über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Membran wurde zweimal mit PBS gewaschen und in Streifen geschnitten.

Schritt 2

Die Streifen wurden für 2-3 Std. mit monoklonalen Antikörpern (in geeigneter Konzentration) in PBS/Triton bei RT inkubiert. Es wurde 3-4 Mal in PBS/Triton gewaschen.

Schritt 3

Danach wurden die Streifen mit einer geeigneten Konzentration eines Peroxidase-konjugierten anti-MauslgG-Antikörpers, bzw. Peroxidase-konjugiertes Protein A für 2 Std. bei RT inkubiert. Die Streifen wurden 4-5 Mal in PBS/Triton gewaschen.

Schritt 4

Für die Substratinkubation wurden 0,5 ml Farbstofflösung (80 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (Sigma) in 10 ml Diethylformamid) mit 8,5 ml Acetatpuffer (50 mM, pH 5,0), 10 µl 30% H_2O_2 und 1 ml 2% Agarose vermischt und auf ein mit

ention. Wasser angefeuchtetes 3MM-Filterpapier gegossen. Nach Erstarrung dieser Schicht wurden darauf die einzelnen Nitrocellulose-Streifen gelegt. Der Substratumsatz erfolgte an der Oberfläche der Streifen, an der das umgesetzte Substrat als unlöslicher rotbrauner Farbkomplex ausfiel. Die Inkubationsdauer betrug etwa 15 Min. bei RT.

2.2.27. Affinitätsreinigung von Antikörpern mit Hilfe eines Protein-Blots (71)

Es wurde elektrophoretisch geblottet. Nach dem Absättigen der freien Proteinbindungsstellen mit BSA wurde wie beschrieben (2.2.26.2) mit monoklonalen Antikörpern inkubiert.
Auf beiden Seiten der Membran wurde ein Streifen abgeschnitten. Diese wurden auch der Inkubation mit einem zweiten Antikörper und der Substratinkubation unterworfen.
Das so erhaltene Bandenmuster ermöglichte, die entsprechenden Banden aus dem nur mit den monoklonalen Antikörpern inkubierten Teil des Blots auszuschneiden.
Die ausgeschnittenen Banden wurden in kleine Stücke zerteilt und in eine 1 ml-Plastikspritze gegeben. In die Spritze wurden 0,5 ml 0,1 M Essigsäure aufgezogen. Damit wurde 2 Min. bei RT inkubiert. Die Essigsäure wurde noch dreimal durch die Nitrocellulose-Stückchen gedrückt. Die Lösung mit den darin enthaltenen Antikörpern wurde mit 2 M Tris-Base auf pH 7,5-8 eingestellt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.28. Isolierung von monoklonalen Antikörpern über Protein A-Sepharose (26,45,61)

Protein A aus der Zellwand von Staphylococcus aureus bindet an den Fc-Teil der Immunglobuline verschiedener Spezies.
Folgende Subklassen der Maus-Immunglobuline binden an Protein A: IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3. Die Subklassen IgG_1 und IgM binden nur schwach oder nicht an Protein A.
Damit besteht die Möglichkeit der Affinitätsreinigung von Maus-Immunglobulinen.

Als Material wurde Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) eingesetzt.

0,6 g dieses Materials wurde in PBS gequollen, mehrmals auf der Glasfritte

gewaschen und in eine Säule gefüllt. Das Bettvolumen der Säule war 1,5 ml. 1 ml gequollenes Material enthielt 2 mg Protein A und hatte damit eine Bindungskapatität von 20 mg Immunglobulin.
Zur Vorbereitung der Isolierung wurde die Säule mit dem 20fachen Säulenvolumen PBS mit 0,1% Natriumazid gewaschen. Der Antikörper enthaltende Überstand einer Hybridomazellinie (maximal 300 ml) wurde abzentrifugiert (20 Min., 3.000 xg), der Überstand mit 2 M Tris-Base auf pH 7,5-8 eingestellt und mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/Std. bei RT über die Säule gepumpt. Danach wurde die Säule mit dem 20fachen Säulenvolumen PBS mit 0,1% Natriumazid gewaschen.
Die Elution erfolgte mit 0,1 M Essigsäure. Die Fraktionen wurden sofort mit 2 M Tris-Base auf pH 7,5-8 eingestellt. Der Proteingehalt wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm (Zeiss-Photometer) an Hand einer Eichkurve abgeschätzt.

2.2.29. Gewinnung von Fab-Fragmenten (61)

Mit Hilfe von Papain kann man Immunglobulin G in ein kristallisierbares Fragment (Fc-Fragment) und zwei Antikörper-bindende Fragmente (Fab-Fragmente) spalten.

Schritt 1: Papainspaltung

Zu 150 µl IgG-Lösung (0,5 mg, über Protein A-Sepharose gereinigt) wurden 15 µl Essigsäure (1 M), 20 µl Cystein (0,1 M), 3 µl Papain (15 µg, 0,25 Units) und einige Körnchen Natriumazid gegeben. Die Inkubation erfolgte für 16 Std. bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl $ZnCl_2$ (0,1 M) gestoppt. Zum Ansatz wurden 50 µl Glycerin gegeben.

Schritt 2: Gelchromatographie

In diesem Schritt wurden die Fab- und Fc-Fragmente (MG etwa 50 kd) vom Papain (23 kd) abgetrennt.
Die Gelchromatographie erfolgte an Sephadex G 50. Das Material hat eine Ausschlußgrenze von 30 kd.
Das Säulenvolumen betrug 5 ml, das Ausschlußvolumen (bestimmt mit Dextranblau) war 1,25 ml. Die Säule wurde mit Tris-Puffer (0,1 M, pH 7,5, 10 mM $ZnCl_2$) äquilibriert. Auf das äquilibrierte Säulenmaterial wurde der Ansatz aus Schritt 1 aufgetragen. Es wurde mit dem Äquilibrierungspuffer eluiert

(Fraktionsgröße 0,3 ml). Der Proteingehalt wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm abgeschätzt.

Schritt 3: Abtrennung der Fc-Fragmente

Die Fraktionen, die die Hauptmenge der Immunglobulinfragmente enthielten, wurden vereinigt. Sie wurden zu 50 mg Protein A-Sepharose (vorgequollen in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, gegeben und damit für 1 Std. bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Abtrennung der Fab-Fragmente im Überstand von den an die Protein A-Sepharose gebundenen Fc-Fragmenten erfolgte durch Zentrifugation (5 Min., 7.000 xg). Die Protein A-Sepharose wurde mit 100 µl Tris/HCl-Puffer nachgewaschen. Die vereinigten Überstände enthielten die Fab-Fragmente.

2.2.30. Agglutinationstest mit Bakterien

Antikörper, die gegen Oberflächenantigene eines Bakterienstammes gerichtet waren, wurden zu diesem Stamm gegeben. Nach Zugabe eines zweiten Antikörpers mit einer Spezifität für den ersten Antikörper, konnte man eine Agglutination der Bakterien beobachten. Durch Vergleich mit Mutanten in Proteinen der äußeren Membran konnten Rückschlüsse auf die Spezifität der Antikörper gezogen werden.

Die Bakterien wurden in TY-Medium bis zur OD 0,5 angezogen, zweimal in PBS gewaschen und in PBS mit 0,01% Triton X-100 zur OD 5,0 aufgenommen. 10 µl der Bakteriensuspension wurden auf eine von einem Vaselinering (ø 17 mm) umgrenzte Fläche eines Objektträgers gegeben. Dazu wurden 10 µl Hybridomakulturüberstand, bzw. 10 µl einer entsprechenden Verdünnung von isolierten monoklonalen Antikörpern unter Rühren gegeben. Als zweiter Antikörper wurden 5 µg (10 µl) Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörper eingesetzt. Nach guter Durchmischung wurde ein Deckglas aufgelegt und für 15-30 Min. bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Mikroskop (Zeiss, 16er- und 40er-Objektive) im Vergleich zu mit Myelomakulturüberstand, bzw. PBS inkubierten Ansätzen.

2.2.31. Bestimmung der Phagenadsorption

Sind Antikörper gegen Phagenrezeptorproteine gerichtet, so sollte nach Vorinkubation der Bakterien mit diesen Antikörpern die Adsorption eines für den entsprechenden Rezeptor spezifischen Phagens deutlich vermindert sein.

Man kann damit die Spezifität eines Antikörpers für einen Rezeptor nachweisen.

Ein für den entsprechenden Phagen sensitiver Bakterienstamm wurde bis zur OD 0,5 angezogen. Die Zellen wurden geerntet, mit Adsorptionspuffer gewaschen und in Adsorptionspuffer zur OD 0,5 resuspendiert. 50 µl wurden in ein Eppendorfcup gegeben und 10-50 µl Hybridomakulturüberstand zugesetzt. Damit wurde unter gelegentlichem Schütteln 30-60 Min. bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µl einer Phagensuspension (etwa 5×10^6 pfu/ml) zugegeben und damit erneut für 30-60 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (2 Min., 7.000 xg) und eine geeignete Verdünnung wurde zu mit einem sensitiven Stamm angeimpften Topagar gegeben und über TY-Agar ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Plaques gezählt. Die Zahl der Plaques ist ein direktes Maß für die nicht adsorbierten Phagen. Als Kontrolle wurden Ansätze gemacht, bei denen statt Hybridomakulturüberstand Überstand der NS-1-Myelomazellinie, bzw. PBS eingesetzt wurde.

2.2.32. Kinetik der Phagenadsorption (34)

Um genauere Aussagen als bei der einfachen Bestimmung der Phagenadsorption zu erhalten, wurde die Zeitabhängigkeit der Adsorption verfolgt. Bei diesem Test wurden isolierte monoklonale Antikörper eingesetzt.

In Vorversuchen war für die Adsorption jedes untersuchten Phagens die optimale Bakteriendichte und das optimale Bakterien/Phagen-Verhältnis ermittelt worden. Als optimal wurde eine Adsorption von 90% oder mehr der Phagen nach 20 Min. angesehen.

Je 100 µl der in PBS gewaschenen Bakteriensuspension (der optimalen Dichte) wurden abzentrifugiert (2 Min., 7.000 xg) und in 3 Parallelansätzen in 100 µl PBS, in 100 µl MausIgG-Lösung (in PBS, Paesel) und in 100 µl Antikörperlösung (isolierte monoklonale Antikörper, in PBS verdünnt) resuspendiert. Damit wurde 30-60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Phagensuspension mit geeignetem Titer und Inkubation bei 37°C wurden 10 µl-Proben zu den Zeiten 0, 5, 10, 15 und 20 Min. entnommen. Nach Verdünnung und Zentrifugation der entnommenen Proben wurde die Zahl der im Überstand enthaltenen Phagen durch Zugabe zu mit einem sensitiven Stamm angeimpften Topagar, Ausplattierung über TY-Agar und Inkubation über Nacht bei 37°C bestimmt.
In einem Diagramm wurden log p/p_o gegen die Zeit t aufgetragen.

Die Adsorptionskonstanten ($K_{ads.}$) wurden nach folgender Näherungsgleichung berechnet:

$$K_{ads.} = \frac{2,3}{B\ t} \log p_o/p$$

B = Zahl der eingesetzten Bakterien pro ml
p_o = Zahl der Phagen zur Zeit t_o
p = Zahl der Phagen zur Zeit t

Diese Näherungsgleichung gilt, wenn, wie hier, wesentlich mehr Bakterien als Phagen eingesetzt wurden.

2.2.33. Colicin M-Test

Colicin M ist ein von bestimmten E. coli-Stämmen produziertes Toxin, das auf andere E. coli-Stämme wirkt. Colicin M gelangt über den FhuA-Rezeptor in die Zelle. Durch Blockierung dieses Rezeptors mit entsprechenden Antikörpern sollte eine Zelle vor diesem Toxin geschützt werden.

Methode 1

Ein $fhuA^+$-Stamm wurde bis zur OD 0,5 angezogen, gewaschen und zu einer OD 0,05 in Saline mit 0,1% Triton X-100 resuspendiert. Davon wurden 50 µl zusammen mit 10 µl Hybridomakulturüberstand für 60 Min. bei RT inkubiert. Dann wurden 40 µl einer Colicin M-Verdünnung in Saline/Triton, die auf der Testplatte gerade noch klare Lysehöfe erzeugte, zugegeben. Damit wurde 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Verdünnung wurden die Ansätze auf TY-Platten ausplattiert. Die Verdünnungen waren so gewählt worden, daß etwa 100 Kolonien pro Platte auftraten.
Als Kontrolle wurden Ansätze gemacht, bei denen statt Hybridomakulturüberstand Überstand der NS-1-Zellinie eingesetzt wurde. Um die Colicin M-Wirkung nachweisen zu können, wurden Ansätze gemacht, in denen statt Colicin M-Lösung nur Saline/Triton enthalten war.

Methode 2

Diese Methode wurde mit isolierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Es wurde eine Absterbekurve aufgenommen.

Dazu wurden 70 µl Bakterien der OD 0,05 in PBS/Triton für 60 Min. mit 20 µl (50 µg) isolierten monoklonalen Antikörpern bei 37°C inkubiert. Dann wurden 10 µl Colicin M-Lösung zugegeben. In Vorversuchen war die Colicin M-Konzentration ermittelt worden, die nach 20 Min. Inkubation mehr als 90% der Zel-

len abgetötet hatte. Direkt nach Zugabe von Colicin M und nach 5, 10, 15 und 20 Min. wurden 10 µl-Proben entnommen, in PBS verdünnt und auf TY-Platten ausplattiert.
Kontrollen wurden mit PBS statt der Antikörper und mit PBS statt Colicin M gemacht.

Zur weiteren Kontrolle wurden bei beiden Methoden die entsprechenden Versuche mit Colicin B gemacht. Colicin B gelangt über den FepA-Rezeptor in die Zelle.

2.2.34. Immunpräzipitation (Version 1)

Dieser Test diente zum Nachweis der Spezifität der monoklonalen Antikörper. Bei dieser Version wurden nicht-markierte Membranproteine und Hybridomakulturüberstände eingesetzt.

100 µl (0,2 mg Protein) einer Präparation der äußeren Membran eines E. coli K-12-Stammes wurden mit 100 µl SDS-Puffer (2% SDS, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA) 5 Min. auf 100°C erhitzt. Zu dem Solubilisat wurden 10 ml Hybridomakulturüberstand (50 µg Antikörper) gegeben und für 2 Std. unter gelegentlichem Schütteln bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µg Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörper zugegeben. Damit wurde für 3 Std. bei RT inkubiert. Es wurde abzentrifugiert (20 Min., 3.000 xg). Das Sediment wurde zweimal mit Puffer (0,1% SDS, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA) gewaschen, in 10 µl Auftragspuffer aufgenommen und 5 Min. auf 100°C erhitzt. Die Proben wurden in der SDS-PAGE analysiert.

Als Kontrolle wurden Ansätze gemacht, in denen statt Hybridomakulturüberstand Überstand der NS-1-Zellinie eingesetzt wurde. Als weitere Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Membranproteine und mit Hybridomakulturüberstand gemacht.

2.2.35. Immunpräzipitation (Version 2) (41,45)

Auch in diesem Test wurde untersucht, welche Membranproteine von den Antikörpern ausgefällt werden. Zur besseren Identifikation wurden die Membranproteine radioaktiv markiert. Es wurden isolierte monoklonale Antikörper eingestzt.

Schritt 1: Markierung der Membranproteine

Die Proteine wurden "in vivo" markiert. Dazu wurde der entsprechende Stamm bis zu einer OD 0,2 angezogen. Davon wurden 0,5 ml abgenommen, zweimal mit M9-Medium gewaschen und in M9-Medium mit 0,4% Glukose 1 Std. bei 37°C inkubiert. Dann wurden 20-40 µl ^{14}C-Aminosäuren (1-2 µCi, Amersham) zugegeben und damit für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Dann wurde abzentrifugiert (2 Min., 7.000 xg) und zweimal mit ention. Wasser gewaschen.

Schritt 2: Solubilisierung der Membranproteine

Methode 1

Zu den gewaschenen Zellen wurden 15 µl Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA) und 5 µl Lysozym (1 mg/ml) gegeben. Es wurde 15 Min. bei -20°C eingefroren und 2 Min. bei 37°C aufgetaut. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Danach wurden 2 µl DNase (1 mg/ml) und 30 µl Octylglucosid (2%) zugegeben und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (10 mM in Methanol) wurde für weitere 30 Min. bei 37°C inkubiert. Es wurde zentrifugiert (10 Min., 7.000 xg). Im Überstand waren die solubilisierten Proteine enthalten.

Methode 2

Zu den gewaschenen Zellen wurden 45 µl SDS-Puffer (2% SDS, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA) gegeben. Damit wurde für 7 Min. im Heizblock (Eppendorf) auf 95°C erhitzt. Dann wurde abzentrifugiert (10 Min., 7.000 xg). Im Überstand waren die solubilisierten Proteine enthalten.

Schritt 3: Voradsorption mit Protein A-Sepharose

Nach Abnahme einer Probe für die SDS-PAGE wurden zu den solubilisierten Proteinen 900 µl Puffer (0,5% (0,05% bei Methode 2) Octylglucosyd, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) und 10 µl 10% BSA-Lösung gegeben. Diese Lösung wurde zu 10 mg Protein A-Sepharose (Pharmacia, vorgequollen im gleichen Puffer) gegeben und 1 Std. unter Rühren bei 4°C inkubiert. Es wurde 10 Min. bei 7.000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde noch zweimal der gleichen Voradsorption unterzogen.

Schritt 4: Inkubation mit monoklonalen Antikörpern

Zur Hälfte der voradsorbierten Proteine wurden jeweils etwa 10 µg gereinigte monoklonale Antikörper gegeben. Damit wurde für 16 Std. unter Rühren bei 4°C

inkubiert. Danach wurden 5 µg der vorgequollenen Protein A-Sepharose pro Ansatz zugesetzt und damit für 1 Std. inkubiert. Es wurde abzentrifugiert (5 Min., 7.000 xg) und zweimal mit jeweils 400 µl Octylglucosid-Puffer gewaschen. Dann wurde einmal mit 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) gewaschen.

Schritt 5: Gelelektrophorese und Autoradiographie

Im Protein A-Sepharose-Pellet waren die monoklonalen Antikörper mit den daran gebundenen Membranproteinen enthalten. Dieses Pellet wurde mit 10 µl Auftragspuffer versetzt und damit 5 Min. auf 100°C erhitzt. Der Überstand wurde in der SDS-PAGE analysiert. Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf Nitrocellulose geblottet (2.2.26.1.). Auf die getrocknete Nitrocellulose-Membran wurde ein Kodak X-OMAT-Film in einer Autoradiographie-Kassette gelegt. Für 10 Tage wurde bei RT exponiert. Der Röntgenfilm wurde nach der Vorschrift des Herstellers entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1. Hybridomalinie D141

3.1.1. Immunisierung

Zur Immunisierung wurde eine Antigenlösung verwendet, die das FhuA-Rezeptorprotein angereichert enthielt (siehe Abb. 1). Die Lösung wurde von K. Hantke zur Verfügung gestellt. Er war dabei von einer OM-Präparation des Stammes PL 6 ausgegangen. Der Proteingehalt wurde nach Acetonfällung auf 1 mg/ml eingestellt. Die Maus wurde im Abstand von 4 Wochen mit je 100 µg geimpft.

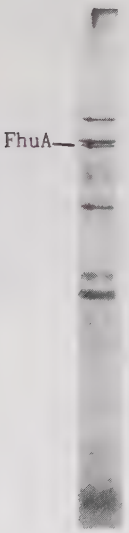

Abb. 1
SDS-PAGE der Antigenlösung für Fusion D

3.1.2. Fusion

Die Fusion wurde wie in 2.2.17. beschrieben 3 Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt. An Stelle des beschriebenen Fusionsreagenzes wurde hier 35% PEG-2000, 15% DMSO und 50% PBS eingesetzt. Das Verhältnis Milz- zu Myelomazellen betrug bei einem Einsatz von 10^8 Milzzellen 10:1. Es wurden keine "feeder"-Zellen eingesetzt

In 109 der 144 Kulturen (76%) waren nach 20 Tagen Hybridzellklone sichtbar. Mit Hilfe des Radioimmunassay wurde auf Antikörperproduktion geprüft. Die PVC-Platten wurden für den Test mit Antigenlösung beschichtet (20 µg/Ver-

tiefung). Insgesamt 9 Klone wurden als positiv erkannt. Ihre Überstände ergaben Meßwerte über 2.500 cpm (Kontrolle mit NS-1-Überstand: 1.700 cpm). Die höchsten Werte lagen bei 4.000 cpm.

3.1.3. Subklonierungen

Bei den Subklonierungen wurde nach der Weichagar-Methode (2.2.18.1.) verfahren. Die Antikörperproduktion der Subklone wurde wieder mit dem Radioimmunassay überprüft. Einige Klone mit starker Antikörperproduktion wurden nochmals subkloniert. Auch hier wurde wieder mit dem Radioimmunassay getestet. Die 2. Subklonierung wurde durchgeführt, um sicher zu stellen, daß ein Klon tatsächlich von einer einzigen Zelle abstammt.

Alle folgenden Ergebnisse beziehen sich auf den nach der 2. Subklonierung erhaltenen Klon D141.

3.1.4. Enzymimmunassay

Im Enzymimmunassay, bei dem die Platten mit der Antigenlösung (20 µg/Vertiefung) beschichtet wurden, ergab sich eine Extinktion von 0,37 für den D141-Überstand, gemessen gegen den Überstand der NS-1-Linie.

3.1.5. Bestimmung der Subklassen

In dem Enzymimmunassay nach 2.2.25. wurde als Subklasse der schweren Ketten IgG_1 und als Subklasse der leichten Ketten kappa festgestellt.

3.1.6. Agglutinationstest

Die Tests wurden wie unter 2.2.30. beschrieben durchgeführt.

Beim ersten Test wurde der Stamm AB 2847 und Überstände der D141- sowie der NS-1-Zellinie eingesetzt. Bei D141 trat eine starke, bei NS-1 keine Agglutination auf (siehe Abb. 2a, b).

Beim zweiten Test wurde der Stamm 1024 eingesetzt, der durch Tn*10*-Insertion in das *fhuA*-Gen kein FhuA-Rezeptorprotein bildet. Mit dem D141-Überstand und auch mit dem NS-1-Überstand konnte eine schwache Agglutination beobachtet werden (siehe Abb. 2c, d).

Dieser Test wies auf eine FhuA-Spezifität der D141-Antikörper hin.

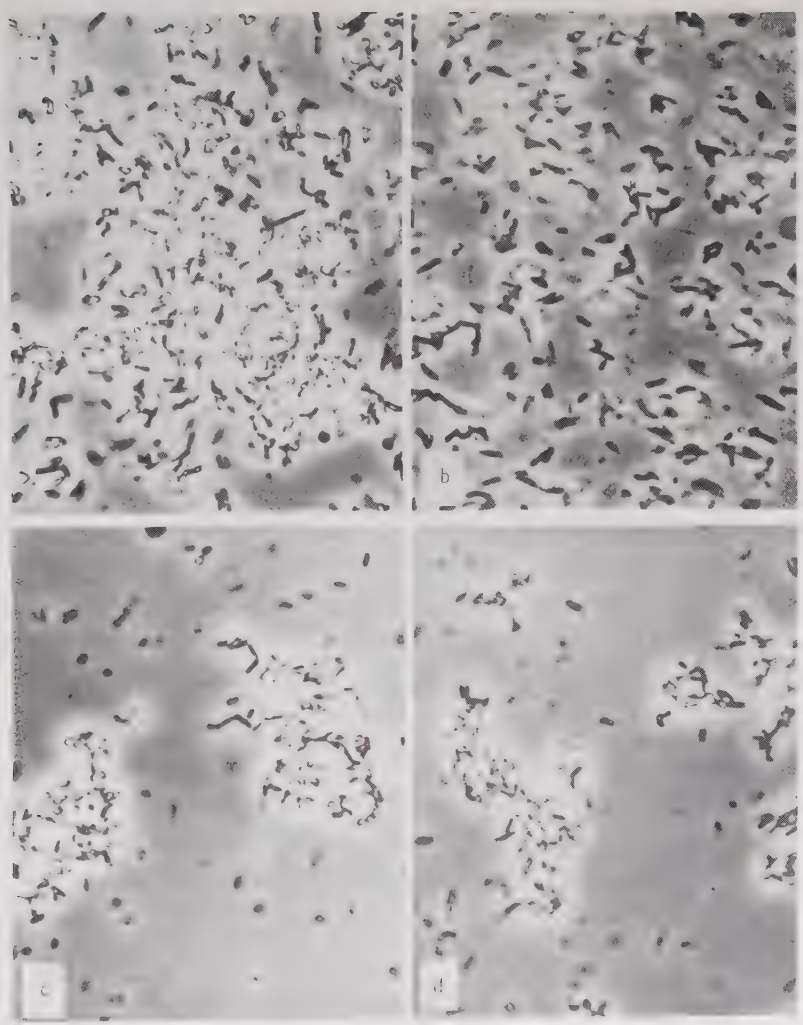

Abb. 2

Agglutination von Zellen des Stammes AB 2847
a) durch D141-Überstand
b) durch NS-1-Überstand

Agglutination von Zellen des Stammes 1024
c) durch D141-Überstand
d) durch NS-1-Überstand

3.1.7. Bestimmung der T5-Phagenadsorption

Der Test wurde nach 2.2.31. durchgeführt. Es wurden 50 µl Bakteriensuspension (AB 2847) mit 10 µl Überstand (D141, NS-1) für 30 Min. bei 37°C vorin-

kubiert. Nach Zugabe von $2,5 \times 10^4$ pfu T5(Weidel)-Phagen wurde 60 Min. bei 37°C inkubiert.
Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Bakterien gemacht.

Tab. 1
Hemmung der T5-Phagenadsorption durch Hybridomakulturüberstände
Bakterien: $2,3 \times 10^8$/ml Phagen: $1,1 \times 10^5$pfu/ml Ansatz: 110 µl

Überstand	Zahl der Plaques/Platte	∅	% Ads.
NS-1, ohne Bakterien	281,282,283,223,244,289	267	0
NS-1, auf AB 2847	45,33,38,48,38,42	40	85,0
D141, auf AB 2847	124,133,128,138,127,135	131	50,9

Man erkennt eine deutliche Hemmung der T5-Adsorption durch den Überstand der D141-Linie. Nach 60 Min. waren noch etwa 3,3 Mal soviel T5-Phagen im Überstand als in der NS-1-Kontrolle.

3.1.8. Bestimmung der BF23-Phagenadsorption

Um auszuschließen, daß die Hemmung der T5-Phagenadsorption durch unspezifische Effekte bewirkt wurde, wurde untersucht, ob auch die Bindung anderer Phagen durch die Überstände der D141-Linie behindert wird.
Der BF23-Phage wurde ausgewählt, da er große Ähnlichkeit mit dem T5-Phagen besitzt (64) und einen in nur wenigen Kopien vorhandenen Rezeptor, das BtuB-Genprodukt, zur Infektion der Zelle benötigt. Hier wäre eine unspezifische Abdeckung durch Antikörper denkbar.

Der Test wurde mit dem Stamm AB 2847 (pro Test 50 µl einer OD 0,5) und 10 µl Überstand durchgeführt. Nach 30 Min. Vorinkubation wurden 50 µl einer BF23-Phagensuspension (2×10^5pfu/ml) zugesetzt und für weitere 45 Min. bei 37°C inkubiert.
Das Ergebnis ist in Tab. 2 dargestellt.

Nach 45 Min. hatten bei beiden Ansätzen praktisch gleichviel BF23-Phagen adsorbiert. Es war keine Hemmung zu beobachten.

Tab. 2

Hemmung der BF23-Phagenadsorption durch Hybridomakulturüberstände

Bakterien: $2{,}3 \times 10^8$/ml Phagen: 9×10^4 pfu/ml Ansatz: 110 µl

Überstand	Zahl der Plaques/Platte	ø	% Ads.
NS-1, ohne Bakterien	542, 560, 570, 588	565	0
NS-1, auf AB 2847	28, 27, 23, 27	26	95,4
D141, auf AB 2847	32, 30, 23, 30	29	94,9

3.1.9. Colicin M-Test

Hierbei wurde untersucht, ob auch die Aufnahme eines anderen Substrats des FhuA-Rezeptors, des Colicins M, durch D141-Antikörper behindert wird.

Der Test wurde wie in Methode 1 beschrieben (2.2.33.) durchgeführt. Es wurde der Stamm AB 2847 eingesetzt. Die Vorinkubation mit Hybridomakulturüberstand erfolgte für 60 Min. bei 37°C. Danach wurde 15 Min. mit einer geeigneten Colicin M-Verdünnung bei 37°C inkubiert.

Tab. 3

Beeinflussung der Colicin M-Wirkung durch Hybridomakulturüberstände

Überstand	Kolonien ohne Colicin M	Kolonien mit Colicin M	% Überlebende
NS-1	65,9	18,8	28,5
D141	74,9	51,6	68,9

Angegeben wurden die Durchschnittswerte aus 4 unabhängigen Tests.

Die D141-Antikörper können also die Bakterien vor der toxischen Wirkung des Colicins M schützen.

3.1.10. Colicin B-Test

Dieser Test wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob eventuell die Antikörper die Colicine inaktivieren.
Das Colicin B gelangt über den FepA-Rezeptor in die Bakterienzelle.

Der Test wurde wie der Colicin M-Test mit dem Stamm AB 2847 durchgeführt. Die Vorinkubation mit den Überständen erfolgte für 45 Min. bei 37°C, die Inkubation mit Colicin B für 25 Min.

Tab. 4
Beeinflussung der Colicin B-Wirkung durch Hybridomakulturüberstände

Überstand	Kolonien ohne Colicin B	Kolonien mit Colicin B	% Überlebende
NS-1	63,6	11,1	17,5
D141	53,2	9,1	17,1

Angegeben wurden die Durchschnittswerte aus 4 unabhängigen Tests.

Die Abtötung war bei beiden Überständen gleich stark. Es war kein Effekt der D141-Antikörper auf die Wirkung von Colicin B zu beobachten.

3.1.11. Blotting

Zunächst wurden Proteine der äußeren Membran des Stammes H 1426 in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Membran war durch 10 Min. Inkubation bei 70°C im Auftragspuffer solubilisiert worden. Pro Spur wurden 25 µg Protein aufgetragen. Anschließend wurde wie beschrieben (2.2.26.1.) für 3 Std. elektrophoretisch geblottet. Zum Nachweis des Proteintransfers und als Referenz wurde ein Streifen des Blots mit Amidoschwarz gefärbt. Die freien Bindungsstellen der Nitrocellulose wurden durch Inkubation mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Dann wurden etwa 4 Spuren mit 5 ml Überstand der D141-Linie und 5 ml PBS/Triton für 1 Std. bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 4 Spuren mit 5 ml NS-1-Überstand und 5 ml PBS/Triton inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/Triton wurden die Streifen gemeinsam mit 30 µl Peroxidase-konjugierten Schaf-anti-MausIgG-Antikörpern ($F(ab')_2$-Fragmente, Cappel) in 1 ml PBS/Triton für 1 Std. bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/Triton wurde die Substratinkubation wie beschrieben (2.2.26.2) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3 dargestellt.

Auch bei den mit NS-1-Überstand inkubierten Streifen war ein leichter Substratumsatz durch gebundene Peroxidase-konjugierte Antikörper zu beobachten. Das läßt darauf schließen, daß der zweite Antikörper auch in gewissem Ausmaß an die aufgetrennten E. coli-Membranproteine bindet.

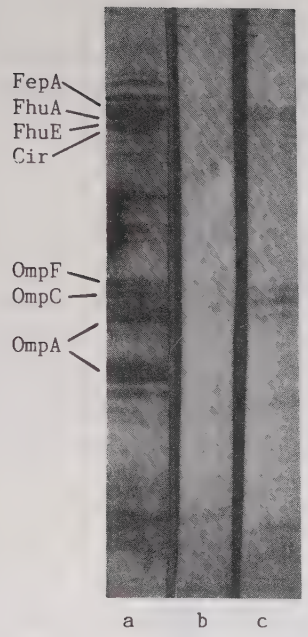

Abb. 3

Ergebnis der Blotting-Inkubation

a) mit Amidoschwarz gefärbte Proteine
b) Immunoblot mit NS-1-Überstand
c) Immunoblot mit D141-Überstand

Bei dem mit dem D141-Überstand inkubierten Streifen war ein stärkerer Substratumsatz zu beobachten. Allerdings wurde ein Großteil der Banden angefärbt. Besonders stark angefärbt waren die FhuA-Bande (evtl. FhuE-Bande) und die darunter liegende Bande. Da diese Banden nicht bei der NS-1-Kontrolle angefärbt wurden, kann man schließen, daß die D141-Antikörper spezifisch gegen diese Proteine gerichtet sind.

3.2. Hybridomalinie K53

3.2.1. Immunisierung

Die Maus wurde mit Bakterien des Stammes AB 2847 immunisiert. Der Stamm wurde bis zur OD 0,5 im beschriebenen M9-Medium angezogen. Die Immunisierungen erfolgten wie beschrieben (2.2.16.) im Abstand von 25 Tagen.

3.2.2. Fusion

Die Fusion wurde 4 Tage nach der zweiten Immunisierung durchgeführt. Als Fusionsreagenz wurden 0,5 ml einer Mischung von 35% PEG-2000, 15% DMSO und

50% PBS verwendet. Das Verhältnis Milz- zu Myelomazellen betrug bei einem Einsatz von $1,5 \times 10^8$ Milzzellen 10:1. Es wurden keine "feeder"-Zellen eingesetzt.
In 60 von 72 Kulturen (83%) waren nach 3 Wochen Klone entstanden.

3.2.3. Agglutinationstest

Die Antikörperproduktion der Klone aus der Fusion wurde mit Hilfe des beschriebenen Agglutinationstests (2.2.30.) überprüft. Als Stamm wurde E. coli AB 2847 verwendet.
Überstände von 36 der 60 entstandenen Klone waren zusammen mit dem 2. Antikörper (Kaninchenserum gegen Mausgammaglobulin, Behring, 1:100 in PBS/Triton verdünnt) in der Lage, die Bakterien zu agglutinieren.

3.2.4. Subklonierungen

Die Subklonierung wurde in Flüssigkultur durchgeführt. Als "feeder"-Zellen wurden Milzzellen einer BALB/c-Maus eingesetzt. Nach 2 Wochen waren in etwa 95% der Zellen enthaltenden Kulturen Klone herangewachsen. Die Antikörperproduktion der Klone wurde wieder mit Hilfe des Agglutinationstests überprüft.
Einige der Klone wurden zum 2. Mal ebenfalls in Flüssigkultur subkloniert. Auch diese Subklone wurden mit dem Agglutinationstest überprüft.

Der Klon K53 war in der Lage, die AB 2847-Zellen stark zu agglutinieren. Auf diesen Klon beziehen sich alle folgenden Ergebnisse.

3.2.5. Bestimmung der Subklassen

In dem Enzymimmunassay nach 2.2.25. wurden bei den K53-Antikörpern als Subklasse der schweren Ketten IgG_1 und als Subklasse der leichten Ketten kappa festgestellt.

3.2.6. Immunpräzipitation

Um herauszufinden, gegen welches Protein der äußeren Membran die K53-Antikörper gerichtet sind, wurden Immunpräzipitationen gemacht. Die Immunpräzipitationen wurden mit Zellkulturüberständen und nicht-markierten Membranproteinen des Stammes H 1426 nach der Version 1 (2.2.34.) durchgeführt.

In Abb. 4 ist das Ergebnis der Immunpräzipitation dargestellt.

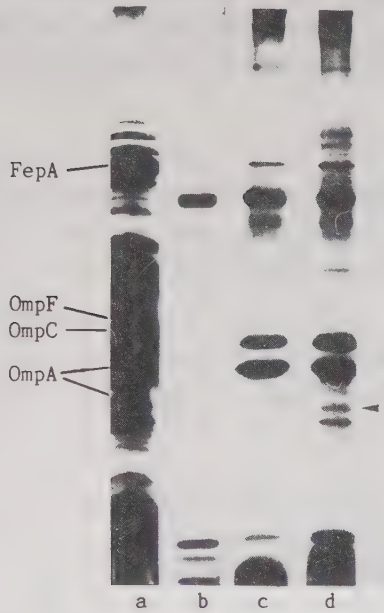

Abb. 4

Ergebnis der Immunpräzipitation

a) Membranmuster des Stammes H 1426
b) ohne Membranproteine, Überstand von K53
c) H 1426-Membranproteine, NS-1-Überstand
d) H 1426-Membranproteine, K53-Überstand

Wie aus Abb. 4 ersichtlich trat bei dem Ansatz mit H 1426-Membranproteinen und K53-Überstand eine deutliche Bande auf, die bei beiden Kontrollen nicht vorhanden war. Bei dieser Bande handelt es sich, wie aus dem Vergleich mit dem Membranmuster zu entnehmen ist, um das nicht Hitze-denaturierte OmpA-Genprodukt.

3.2.7. Agglutinationstest mit dem Stamm PL 6

Um zu überprüfen, ob das Ergebnis der Immunpräzipitation in anderen Tests reproduzierbar war, wurde ein Agglutinationstest mit einer Mutante (PL 6), der das OmpA-Genprodukt in der äußeren Membran fehlt, durchgeführt.

Der Test wurde wie in 2.2.30. beschrieben durchgeführt.

Der Überstand der K53-Linie konnte diesen Stamm nicht agglutinieren (entsprach der NS-1-Kontrolle). Zum Vergleich wurde der Überstand der D141-Linie (siehe 3.1.) eingesetzt, der auch diesen Stamm agglutinieren konnte.

3.2.8. TuII*-Phagenbindungstest

Der TuII*-Phage benutzt das OmpA-Genprodukt (auch: Protein II*) als Rezeptor. Wenn die K53-Antikörper tatsächlich gegen dieses Protein gerichtet sind, müßten sie die Adsorption der TuII*-Phagen behindern können.

Der Test wurde mit dem Stamm AB 2847 durchgeführt. Eingesetzt wurden 50 µl einer OD 0,05 und 10 µl Überstand. Damit wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µl TuII*-Phagensuspension (10^5pfu/ml) zugesetzt und für weitere 45 Min. bei 37°C inkubiert.
Das Ergebnis ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5
Hemmung der TuII*-Phagenadsorption durch Hybridomakulturüberstände
Bakterien: $2{,}3 \times 10^7$/ml Phagen: $4{,}5 \times 10^4$pfu/ml Ansatz: 110 µl

Überstand	Zahl der Plaques/Platte	ø	% Ads.
NS-1, ohne Bakterien	294, 300, 289, 280	291	0
NS-1, auf AB 2847	186, 200, 187, 240	203	30,2
K53, auf AB 2847	266, 302, 235, 229	258	11,3

Bei der Kontrolle mit NS-1-Überstand hatten nach 45 Min. fast dreimal soviel TuII*-Phagen adsorbiert als beim Ansatz mit K53-Überstand. Die Adsorption wurde deutlich behindert.

3.2.9. K3-Phagenbindungstest

Der K3-Phage benutzt genau wie der TuII*-Phage das OmpA-Genprodukt als Rezeptor. Um auszuschließen, daß die Hemmung der TuII*-Phagenadsorption durch Bindung der Antikörper an den Phagen erfolgte, wurde der Test mit dem K3-Phagen wiederholt.

Hier wurde auch der Stamm AB 2847 (50 µl einer OD 0,05) eingesetzt. Vorinkubiert wurde für 30 Min. bei 37°C mit 10 µl Überstand. Es wurden 50 µl

Phagensuspension (5×10^4pfu/ml) zugesetzt und für weitere 40 Min. bei 37°C inkubiert.
Das Ergebnis ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6
Hemmung der K3-Phagenadsorption durch Hybridomakulturüberstände
Bakterien: $2{,}3 \times 10^7$/ml Phagen: $2{,}3 \times 10^4$pfu/ml Ansatz: 110 µl

Überstand	Zahl der Plaques/Platte	ø	% Ads.
NS-1, ohne Bakterien	301, 328, 328, 309	316,5	0
NS-1, auf AB 2847	199, 260, 191, 208	214,5	32,2
K53, auf AB 2847	293, 277, 289, 289	287	9,3

Nach 40 Min. hatten bei der NS-1-Kontrolle etwa 3,5 Mal soviel K3-Phagen adsorbiert als beim Ansatz mit K53-Überstand.
Damit wurde das Ergebnis aus dem TuII*-Test bestätigt.

Die K53-Antikörper sind gegen das OmpA-Genprodukt gerichtet.

3.3. Hybridomalinie AJ235

3.3.1. Immunisierung

Die Maus wurde mit einer Präparation der äußeren Membran des Stammes H 1426 immunisiert. Bei diesem Stamm werden durch eine fur-Mutation (ferric uptake regulation) die Eisentransportproteine überproduziert (siehe Abb. 5).
Im Abstand von 4 Wochen wurde die Maus mit jeweils 80 µg Membranprotein wie beschrieben (2.2.16.) immunisiert.

3.3.2. Fusion

Die Fusion wurde 5 Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt. Es wurde 1 ml des beschriebenen Fusionsreagenzes (2.2.17.4.) eingesetzt. Das Verhältnis Milz- zu Myelomazellen betrug 1:1. Es wurden jeweils insgesamt $1{,}5 \times 10^7$ Zellen eingesetzt.
Als "feeder"-Zellen wurden pro Kultur 5×10^4 Peritoneal-Makrophagen einge-

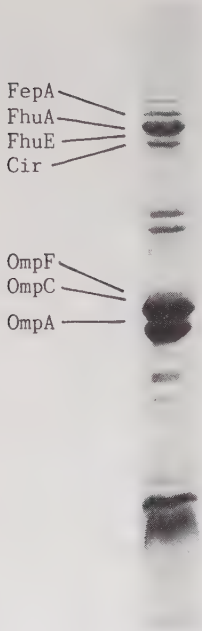

Abb. 5
SDS-PAGE der äußeren
Membran des Stammes H 1426

setzt, die am Vortag isoliert und verteilt worden waren.
Nach 2 Wochen waren in 73 der 144 Kulturen (51%) Klone gewachsen. Die verhältnismäßig geringe Zahl der entstandenen Klone läßt sich auf den Einsatz von nur $1{,}5 \times 10^7$ Milzzellen zurückführen.

3.3.3. Screening

Die Antikörperproduktion der entstandenen Klone wurde mit Hilfe des Enzymimmunassays überprüft. Die Mikrotiterplatten für den Test wurden mit 2 µg Protein einer OM-Präparation des Stammes H 1426 pro Vertiefung beschichtet. Der Test wurde wie beschrieben (2.2.23.) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte qualitativ.
Bei Überständen von 11 der 73 entstandenen Klone trat ein deutlicher Substratumsatz auf, was auf eine Antikörperproduktion schließen ließ.

3.3.4. Subklonierungen

Einige der am stärksten produzierenden Klone wurden nach der Flüssigkulturmethode subkloniert. Die Effizienz der Klonierung lag bei über 95%. Die Antikörperproduktion der Subklone wurde mit dem Enzymimmunassay (Antigen:

Proteine der äußeren Membran des Stammes H 1426) überprüft.
Einige der positiven Subklone wurden nochmals subkloniert. Diese 2. Subklonierung dient der Sicherstellung, daß die entsprechende Zellinie tatsächlich aus einer einzigen Zelle hervorgegangen ist.
Ein Klon wurde aufgrund eines erneuten Enzymimmunassays als stark produzierend erkannt. Auf diesen Klon AJ235 beziehen sich alle folgenden Ergebnisse.

3.3.5. Bestimmung der Subklassen

Die Subklassenbestimmung wurde wie beschrieben mit dem entsprechenden Enzymimmunassay (2.2.25.) durchgeführt. Für die AJ235-Antikörper wurde als Subklasse der schweren Ketten IgG_{2b}, der leichten Ketten kappa festgestellt.

Tritt bei der Subklassenbestimmung nur jeweils eine Subklasse für die schweren und die leichten Ketten auf, hat man eine zusätzliche Sicherheit, daß es sich um eine Zellinie handelt, die aus einer einzigen Zelle hervorgegangen ist.

3.3.6. Enzymimmunassay mit Membranproteinen des Stammes H 1426 und Lipopolysaccharid aus Escherichia coli K-12

Da Lipopolysaccharid aus Escherichia coli allgemein als ein sehr starkes Antigen betrachtet wird (46), liegt bei einer starken immunologischen Reaktion die Vermutung nahe, daß sie auf Lipopolysaccharid zurückzuführen ist.

Die Linien aus der Fusion AJ hatten wesentlich höhere Antikörpertiter als Linien aus früheren Fusionen. Deshalb wurde geprüft, ob die Antikörper gegen LPS gerichtet sind. Die Präparationen der äußeren Membran enthalten LPS, sodaß auch positive Reaktionen im Enzymimmunassay theoretisch möglich sind.

Es wurden Enzymimmunassays durchgeführt, bei denen mit verschiedenen Konzentrationen an Membranproteinen des Stammes H 1426 und verschiedenen LPS-Konzentrationen beschichtet worden war. Das LPS wurde von K. Hantke nach der Methode von Galanos et al. (23) isoliert. Wie eine Untersuchung in der SDS-PAGE ergab, war diese Präparation zu etwa 1% mit Membranproteinen verunreinigt.

Die Enzymimmunassays wurden wie beschrieben (2.2.23.) durchgeführt. Die Extinktionen wurden bei 450 nm im ELISA-Reader (Flow) gemessen.

Das Ergebnis dieser Enzymimmunassays ist in der Tab. 7 dargestellt (Zusammenfassung von 3 unabhängigen Tests)

Tab. 7
Ergebnis der Enzymimmunassays mit LPS und OM-Proteinen

Beschichtung (ng/Vertiefung)	LPS aus E. coli K-12					OM-Proteine aus H 1426				
	2000	200	20	4	0,8	2000	200	20	4	0,8
Extinktion (450nm)										
mit NS-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mit AJ235	0,40	0,20	0,04	0,02	0	>2,0	0,90	0,40	0,25	0

Wie aus der Tab. 7 zu entnehmen, waren die Reaktionen mit OM-Proteinen wesentlich stärker als mit LPS. Aus diesen Daten kann man den Schluß ziehen, daß die Reaktionen mit LPS auf die als Verunreinigungen enthaltenen OM-Proteine zurückzuführen sind, und die Reaktionen mit OM-Proteinen nicht etwa auf Verunreinigungen mit LPS.

3.3.7. Agglutinationstest

Um herauszufinden, gegen welche Proteine der äußeren Membran die AJ235-Antikörper gerichtet sind, wurden Agglutinationstests mit verschiedenen Mutanten in Proteinen der äußeren Membran durchgeführt.

Eingesetzt wurden folgende Stämme:

a) AB 2847 (als Referenz)
b) H 315 (ompC)
c) JW 030 (ompC ompF phoE^{c})
d) 72-6 (ompF fhuA)

(Eine vollständige Charakterisierung der Stämme findet sich in 2.1.4.)

Diesen Mutanten fehlen also entweder jeweils ein, bzw. beide Porine. Beim Stamm 72-6 fehlt zusätzlich der FhuA-Rezeptor.

Die Proteinmuster dieser Stämme sind in Abb. 6 dargestellt.

Die Agglutinationstests wurden wie beschrieben (2.2.30.) durchgeführt. Die Ergebnisse von 2 Tests (jeweils Doppelansätze) sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Abb. 6

SDS-PAGE der äußeren Membran folgender Stämme:

a) AB 2847
b) H 315
c) JW 030
d) 72-6

Tab. 8

Ergebnis der Agglutinationstests mit Mutanten

Überstand	AB 2847	H 315 ompC	JW 030 ompC ompF	72-6 ompF fhuA
NS-1	- / (+)	- / (+)	- / (+)	- / (+)
AJ235	+ / +	++ / ++	+ / ++	- / (+)

\- keine Agglutination
(+) schwache "
\+ gute "
++ sehr starke "

Man erkennt deutlich, daß die AJ235-Antikörper nicht in der Lage sind, Zellen des Stammes 72-6 zu agglutinieren. Diesem Stamm fehlt das OmpF-Protein, sowie der FhuA-Rezeptor. Da dem Stamm JW 030 ebenfalls das OmpF-Protein fehlt, kann man aus diesen Test einen Hinweis auf eine FhuA-Spezifität der Antikörper entnehmen. Es könnte aber auch sein, daß die positive Reaktion mit dem Stamm JW 030 aufgrund des PhoE-Proteins erfolgt, daß große Ähnlichkeit mit dem OmpF-Protein hat (60).

3.3.8. Enzymimmunassay mit Bakterien

Dieser Enzymimmunassay diente der Überprüfung der Ergebnisse des Agglutinationstests.
Der Test wurde ebenfalls mit den Stämmen AB 2847, H 315, JW 030 und 72-6 durchgeführt. Die Stämme wurden in TY-Medium angezogen. Die Beschichtung erfolgte mit 50 µl einer OD 0,6 in PBS (siehe 2.2.23.). Der Test wurde wie dort beschrieben durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Das Ergebnis ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9
Ergebnis des Enzymimmunassays mit Bakterien

Stamm	AB 2847	H 315	JW 030	72-6
E_{450}				
mit NS-1	0	0	0	0
mit AJ235	0,30	0,40	0,30	0,15

In der Tab. 9 wurden die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Tests (jeweils Doppelansätze) zusammengefaßt.

Das Ergebnis des Agglutinationstests wurde mit diesem Test also bestätigt. Auch bei diesem Enzymimmunassay reagieren die AJ235-Antikörper am schwächsten mit dem Stamm 72-6.

Um zu überprüfen, wie hoch die Schwankung der Extinktionswerte in Abhängigkeit von der eingesetzten Bakterienzahl ist, wurde ein Enzymimmunassay durchgeführt, bei dem mit 4 verschiedenen Zelldichten des Stammes AB 2847 beschichtet wurde. Es wurden folgende OD eingesetzt: 0,3, 0,45, 0,6 und 0,9. Das Ergebnis ist in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10
Ergebnis des Enzymimmunassays mit dem Stamm AB 2847

Bakteriendichte (OD)	0,30	0,45	0,60	0,90
E_{450} mit AJ235	0,23	0,25	0,27	0,31

Die Abhängigkeit von der Zelldichte der eingesetzten Bakterien ist nicht

groß. Die Ergebnisse aus Tab. 9 lassen sich danach nicht auf Unterschiede in der Beschichtungsdichte zurückführen.

3.3.9. Isolierung der AJ235-Antikörper

Die Isolierung erfolgte affinitätschromatographisch über Protein A-Sepharose CL-4B (siehe 2.2.28.).
200 ml des Zellkulturüberstandes wurden in 18 Std. über die Säule gepumpt, anschließend wurde mit 50 ml PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Essigsäure. Die Fraktionen wurden mit 2 M Tris auf pH 7,5-8 eingestellt. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt. Aus 200 ml Überstand wurden 3-5 mg reine Antikörper erhalten.

3.3.10. Charakterisierung der isolierten AJ235-Antikörper

Die Antikörper wurden in der SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 7).

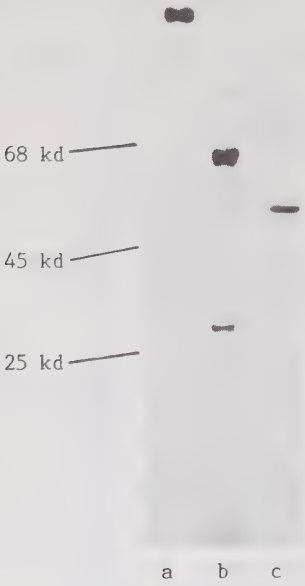

Abb. 7
SDS-PAGE der isolierten AJ235-Antikörper und der AJ235-Fab-Fragmente

a) nicht reduzierte Antikörper
b) mit ß-Mercaptoethanol reduz. Antikörper
c) nicht reduzierte Fab-Fragmente

Bei den nicht reduzierten Antikörpern tritt nur eine Bande im Bereich 150 kd auf. Bei den reduzierten Antikörpern treten eine Bande bei 55 kd (schwere Ketten) und 2 Banden bei 25 kd (leichte Ketten) auf.

Die Aktivität der isolierten AJ235-Antikörper wurde im Enzymimmunassay (Platten mit OM-Proteinen des Stammes H 1426 beschichtet) getestet. Mit einer 1:500-Verdünnung der Antikörperlösung wurde eine Extinktion von 0,5 bei 450 nm erreicht. Das entsprach in etwa der Extinktion des Zellkulturüberstandes.

Die Aktivität der isolierten Antikörper wurde weiterhin durch Wiederholung der Agglutinationstests sowie des Enzymimmunassays mit Bakterien (beide Tests wieder mit den Stämmen AB 2847, H 315, JW 030 und 72-6) überprüft. Die Ergebnisse dieser Tests entsprachen denen, die mit Kulturüberstand der Zellinie erhalten worden waren.

Von diesen isolierten Antikörpern wurden nochmals die Subklassen im Enzymimmunassay bestimmt. Dafür wurde eine 1:300-Verdünnung des Isolats eingesetzt. Als Subklassen konnten IgG_{2b} für die schweren Ketten und kappa für die leichten Ketten bestätigt werden.

Für weitere Versuche war es wichtig zu wissen, wieviel Antikörper für die Versuche vorhanden waren.
Immunglobuline G haben ein Molekulargewicht von etwa 150.000 dalton. Das heißt ein Mol (etwa 6×10^{23} Moleküle) entspricht 150.000 g. Dann entsprechen 1 mg Protein etwa 4×10^{15} Antikörpermolekülen.

3.3.11. Gewinnung von Fab-Fragmenten aus AJ235-Antikörpern

0,5 mg der isolierten AJ235-Antikörper wurden mit Papain gespalten. Die Spaltung, Abtrennung des Papains und der Fc-Fragmente erfolgte wie unter 2.2.29. beschrieben.

Es wurden 0,2 mg Fab-Fragmente erhalten (60% der theoretisch möglichen Menge), die in der SDS-PAGE analysiert wurden (siehe Abb. 7).
Man sieht ausschließlich 2 Banden im Bereich 50 kd. Dabei handelt es sich um die Fab-Fragmente. Das Auftreten von 2 Banden kann auf die mögliche Existenz von Hybridantikörpern zurückzuführen sein. Diese Antikörper enthalten sowohl leichte Ketten, die von den Genen der Milzzelle kodiert werden, als auch leichte Ketten, die von den Genen der Myelomazelle kodiert werden. In den Hybridomazellen können die Gene beider Ausgangszellen enthalten sein und exprimiert werden.

3.3.12. Blotting mit AJ235-Antikörpern

Der immunologische Nachweis geblotteter Proteine ist prinzipiell eine geeignete Möglichkeit, um die Antigenspezifität von Antikörpern zu bestimmen. Im Idealfall wird nach der Inkubation mit dem Antikörper, von dem die Antigenspezifität bestimmt werden soll, nach der Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Antikörper und nach der Substratinkubation nur eine Bande (das Antigen) markiert sein.

OM-Proteine des Stammes H 1426 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Pro Spur wurden 25 µg Protein aufgetragen. Die Proteine waren durch 10 Min. Inkubation bei 70°C solubilisiert worden. Es wurde nach 2.2.26.1. elektrophoretisch auf Nitrocellulose geblottet. Die freie Proteinbindungskapazität wurde durch Inkubation mit 1% BSA abgesättigt.
4 Spuren wurden mit 10 µl isolierten AJ235-Antikörpern in 1 ml PBS/Triton für 90 Min. bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 4 Spuren nur mit PBS/Triton inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden alle Spuren gemeinsam mit 30 µl Schaf-anti-MausIgG-Antikörper ($F(ab')_2$-Fragmente, Cappel) in 1 ml PBS/Triton für 60 Min. bei RT inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 8 dargestellt.

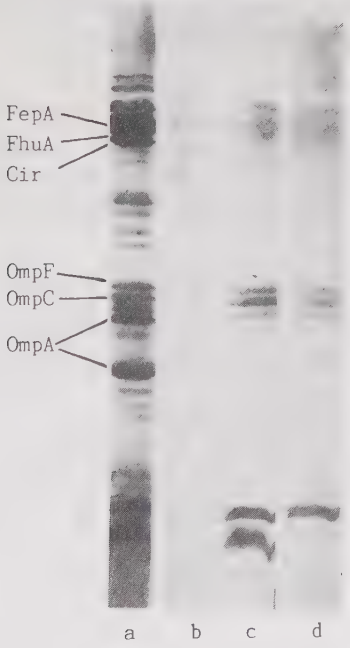

Abb. 8

Ergebnis der Blotting-Inkubation

a) mit Amidoschwarz gefärbte Proteine
b) Immunoblot, nur 2. Antikörper
c) Immunoblot mit isolierten AJ235-Antikörpern
d) Immunoblot mit Peroxidase-konjugierten AJ235-Antikörpern

Man erkennt deutlich, daß schon mit dem 2. Antikörper alleine ein geringer Substratumsatz auftritt.
Bei den mit den isolierten AJ235-Antikörpern inkubierten Streifen sind viele Banden durch umgesetztes Substrat angefärbt, besonders die Eisenrezeptorproteine (im Bereich 70-85 kd) und die Hauptproteine außer dem OmpA-Protein.

Die schwache Bindung des 2. Antikörpers an die E. coli-Membranproteine ließ sich nicht völlig vermeiden. Bei den Versuchen waren zunächst andere Peroxidase-konjugierte Antikörper eingesetzt worden. Die Bindung von ganzen Immunglobulinen war noch stärker als die der später eingesetzten Fab-Fragmente. Auch durch Affinitätsreinigung (2.2.22.) konnte diese Bindung der 2. Antikörper nicht vollständig verhindert werden. Versuche mit Peroxidase-konjugiertem Protein A waren ebenfalls nicht erfolgreicher. Eine leichte Verminderung dieser unspezifischen Bindung ließ sich durch Verwendung von 10% FCS in PBS zum Absättigen der freien Proteinbindungskapazität erreichen (28).

Insgesamt hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Inkubationszeiten kurz zu halten. Mit dem 1.Antikörper (in der Regel ein monoklonaler Antikörper) sollte nicht länger als 2 Std. bei RT inkubiert werden. Mit dem 2. Antikörper reichte eine Inkubationszeit von 1 Std. bei RT aus. Verlängerte Inkubationen führten nur zu einer Erhöhung der unspezifischen Bindung.

3.3.13. Blotting mit Fab-Fragmenten der AJ235-Antikörper

Da es möglich ist, daß Antikörper mit ihrem Fc-Teil unspezifisch an bakterielle Membranproteine binden (28,42), wurde das Blotting auch mit Fab-Fragmenten der AJ235-Antikörper durchgeführt.
Es wurde wieder die äußere Membran des Stammes H 1426 eingesetzt. Die erste Inkubation erfolgte mit 20 µg der isolierten Fab-Fragmente (siehe 3.3.11.) für 2 Std. bei RT. Die weiteren Inkubationen erfolgten wie beim Blotting mit isolierten AJ235-Antikörpern beschrieben.

Das Ergebnis der Inkubation entsprach dem, das mit den isolierten AJ235-Antikörpern erhalten worden war. D.h. es wurde wieder eine ganze Reihe von Membranproteinen durch Substratumsatz angefärbt. Diese Bindung erfolgt also nicht über den Fc-Teil der Antikörper.

3.3.14. Blotting mit Peroxidase-konjugierten AJ235-Antikörpern

Um die leichte unspezifische Bindung durch den 2. Peroxidase-konjugierten Antikörper auszuschalten, wurden aus Überständen der AJ235-Zellinie Antikörper durch Natriumsulfatfällung (2.2.20.) isoliert und mit Peroxidase gekoppelt (2.2.21.).
Mit diesen konjugierten Antikörpern wurde ein Immunoblot durchgeführt, wobei sich die Inkubation mit dem 2. Antikörper erübrigte. Das Ergebnis ist in Abb. 8 d dargestellt.
Man erkennt die gleiche Anfärbung wie bei dem herkömmlichen immunologischen Nachweis mit den AJ235-Antikörpern unter Verwendung eines 2. markierten Antikörpers.

3.3.15. Blotting mit affinitätsgereinigten AJ235-Antikörpern

AJ235-Antikörper wurden wie beschrieben (2.2.27.) mittels eines Proteinblots der H 1426-Membran gereinigt.

Es wurden 3 Banden ausgeschnitten, jeweils auf der Breite von 5 Spuren:

a) OmpA-Bande
b) OmpC/OmpF-Doppelbande
c) FepA-Bande

Von diesen Banden wurden die Antikörper mit 0,1 M Essigsäure eluiert. Die Eluate wurden mit 2 M Tris auf pH 7,5-8 eingestellt.
Mit der Hälfte der Eluate wurden jeweils 2 Spuren eines neuen Proteinblots der OM des Stammes H 1426 inkubiert. Die affinitätsgereinigten Antikörper waren auf 1 ml mit PBS/Triton verdünnt worden. Die Inkubation erfolgte für 2 Std. bei RT. Anschließend Inkubation mit dem 2. Antikörper ($F(ab')_2$-Fragment, Cappel) für 1 Std. bei RT und Substratinkubation.
Das Ergebnis ist in Abb. 9 dargestellt.

Wie der Abb. 9 zu entnehmen, haben die affinitätsgereinigten Antikörper bei der 2. Inkubation nicht nur an das Antigen gebunden, von dem sie isoliert worden waren, sondern wieder an mehrere Proteine.

Es handelt sich also entweder um kreuzreagierende monoklonale Antikörper oder die Bindung der Antikörper an die denaturierten Membranproteine erfolgt relativ unspezifisch.

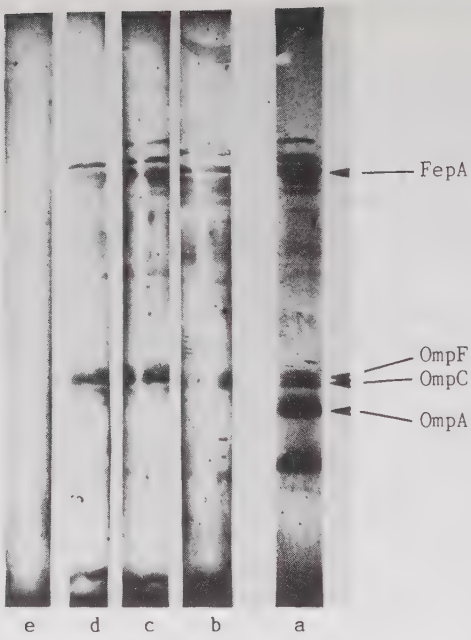

Abb. 9

Ergebnis der Blottinginkubation mit affinitätsgereinigten AJ235-Antikörpern

a) 1. Blottinginkubation (die Pfeile markieren die ausgeschnittenen Banden für die 2. Blottinginkubation)
b) 2. Blottinginkubation (OmpA-Bande)
c) 2. " (OmpC/OmpF-Doppelbande)
d) 2. " (FepA-Bande)
e) 2. " (nur 2. Antikörper)

3.3.16. Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen sind eine andere Möglichkeit, um die Antigenspezifität eines Antikörpers zu bestimmen.

Diese Immunpräzipitationen wurden nach der beschriebenen Version 2 (2.2.35.) mit ^{14}C-markierten Antigen durchgeführt.

Es wurde der Stamm W 3110 eingesetzt. Die Membranen wurden mit ^{14}C-Aminosäuren markiert und mit SDS solubilisiert. Nach Vorinkubation mit Protein A-Sepharose wurde mit 20 µg isolierten AJ235-Antikörpern inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit Protein A-Sepharose ausgefällt und ge-

waschen. Nach Solubilisierung der Komplexe wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und für 10 Tage autoradiographiert.
Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

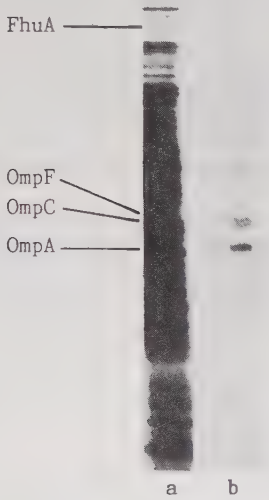

Abb. 10

Ergebnis der Immunpräzipitation (Autoradiogramm)

a) markierte Proteine des Stammes W 3110
b) Präzipitat mit AJ235-Ak

Durch die AJ235-Antikörper wurden mehrere Proteine ausgefällt. Es hat den Anschein, daß besonders die Proteine ausgefällt wurden, die in höherer Kontration auftreten.

Die genau gleiche Immunpräzipitation wurde mit durch Octylglucosid solubilisierten Membranproteinen durchgeführt. Bei dieser Solubilisierung sollte die native Struktur der Proteine im Gegensatz zur SDS-Solubilisierung weitgehend erhalten bleiben. Das Ergebnis entsprach dem, das mit den SDS-solubilisierten Proteinen erhalten worden war.

Also lassen sich auch mit den Immunpräzipitationen keine eindeutigen Aussagen über die Antigenspezifität der AJ235-Antikörper machen.

3.3.17. Kinetik der T5-Phagenadsorption (Stamm W 3110)

Aus dem Agglutinationstest mit verschiedenen Mutanten war der Hinweis auf eine eventuelle FhuA-Spezifität der AJ235-Antikörper erhalten worden. Dieser

Hinweis wurde mit der folgenden Kinetik der T5-Phagenadsorption überprüft. Wie bereits erwähnt, braucht der T5-Phage das FhuA-Genprodukt zur Infektion der Zelle. Wird der FhuA-Rezeptor durch entsprechende Antikörper abgedeckt, sollte die Adsorption der Phagen behindert sein.

Der Test wurde nach 2.2.32. mit dem Stamm W 3110 durchgeführt.

In Vorversuchen ergab sich für die optimale T5-Phagenadsorption eine Zelldichte von 5×10^9 Zellen/ml und eine Phagenkonzentration von 5×10^6 pfu/ml (also 1 Phage auf 10^3 Bakterien).
Die Vorinkubation erfolgte mit PBS, mit MausIgG (25 µg, unspezifische polyklonale Immunglobuline) und mit 25 µg isolierten AJ235-Ak für 30 Min. bei 37°C. Dann wurden die T5-Phagen zugesetzt.
Die nicht adsorbierten Phagen wurden auf W 3110 als Indikatorstamm ausplattiert.
Aus der Zahl der nicht adsorbierten Phagen zu jedem Zeitpunkt wurde das p/p_o-Verhältnis berechnet und die Adsorptionskinetik (Abb. 11) erstellt.

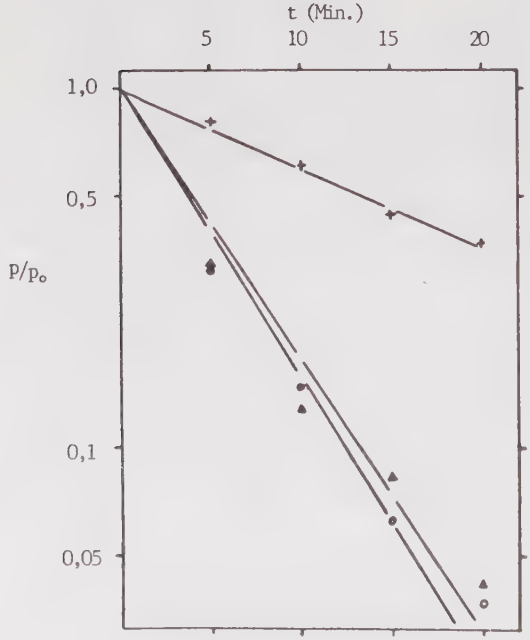

Abb. 11

T5-Phagenadsorption an den Stamm W 3110

Zelldichte: 5×10^9/ml

Phagen: 5×10^6 pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (25 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (25 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $3{,}37 \times 10^{-11}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $9{,}51 \times 10^{-12}$ ml x Min^{-1}

Durch die AJ235-Antikörper wird die Adsorptionskonstante der T5-Phagen um den Faktor 3,5 vermindert.

3.3.18. Kinetik der T5-Phagenadsorption (Stamm HO 831)

Der Stamm HO 831 trägt ein Plasmid mit dem fhuA-Gen. Wird dieser Stamm bei 30°C in TY-Medium mit 50 µg Neomycin/ml und 0,2% Glukose angezogen, wird etwa die zehnfache Menge an FhuA-Rezeptorprotein in die äußere Membran im Vergleich zum Wildtyp eingebaut.

Der Test wurde mit dem bis zur OD 0,5 angezogenen Stamm HO 831 durchgeführt. Die T5-Phagenadsorption verlief optimal, wenn 5×10^8 HO 831-Zellen/ml und 5×10^6 T5-Phagen eingesetzt wurden (also 1 Phage auf 100 Bakterien). Die Vorinkubation erfolgte 30 Min. bei 37°C. Die Phagen wurden auf dem Stamm W 3110 ausplattiert.
Das Ergebnis des Tests ist der Kinetik in Abb. 12 zu entnehmen.

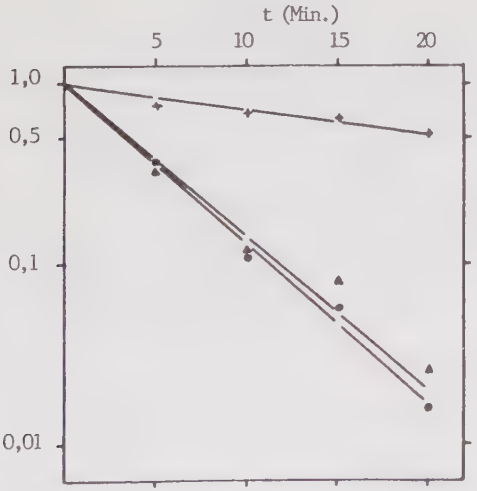

Abb. 12

T5-Phagenadsorption an den Stamm HO 831

Zelldichte: 5×10^8/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (25 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (25 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $8{,}14 \times 10^{-11}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $1{,}20 \times 10^{-11}$ ml x Min^{-1}

Durch die AJ235-Antikörper wird die Adsorptionskonstante der T5-Phagen an den Stamm HO 831 etwa um den Faktor 6,8 vermindert.

3.3.19. Kinetik der T2-Phagenadsorption (Stamm H 315)

Da den Agglutinationstests auch ein Hinweis auf eine eventuelle OmpF-Spezifität der AJ235-Antikörper zu entnehmen war, wurde untersucht, ob die T2-Phagenadsorption (Rezeptor OmpF) durch diese Antikörper gehemmt wird.

Der Test wurde mit dem Stamm H 315 durchgeführt. Bei einer Zelldichte von 5×10^8/ml und mit 5×10^6 Phagen/ml war die Adsorption optimal.
Die Vorinkubation erfolgte für 30 Min. bei 37°C.
Die Zahl der nicht adsorbierten Phagen wurde auf E. coli BS-1 als Indikatorstamm bestimmt.
Aus den erhaltenen Daten wurde die Adsorptionskinetik (Abb. 13) erstellt.

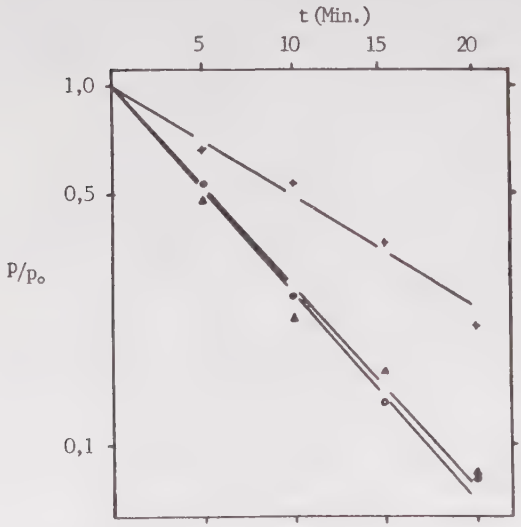

Abb. 13

T2-Phagenadsorption an den Stamm H 315

Zelldichte: 5×10^8/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (250 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (250 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $4{,}92 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $2{,}70 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

Durch die AJ235-Antikörper wird die Adsorptionskonstante der T2-Phagen an den Stamm H 315 etwa um den Faktor 1,8 vermindert.

3.3.20. Kinetik der T2-Phagenadsorption (Stamm 1024)

Die geringe Hemmung der T2-Phagenadsorption an den Stamm H 315 kann zwei Ursachen haben. Die AJ235-Antikörper reagieren auch mit dem OmpF-Protein (Kreuzreaktion) oder die Hemmung der T2-Adsorption wird sterisch durch an den FhuA-Rezeptor gebundene Antikörper bewirkt.
Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde die T2-Adsorptionskinetik mit dem Stamm 1024 wiederholt. Durch eine Tn10-Insertion in das fhuA-Gen wird kein FhuA-Rezeptor von diesem Stamm gebildet.

Der Test mit dem Stamm 1024 wurde genau wie die T2-Kinetik mit dem Stamm H 315 durchgeführt. Es wurde wieder auf E. coli BS-1 ausplattiert.
Das Ergebnis ist der Abb. 14 zu entnehmen.

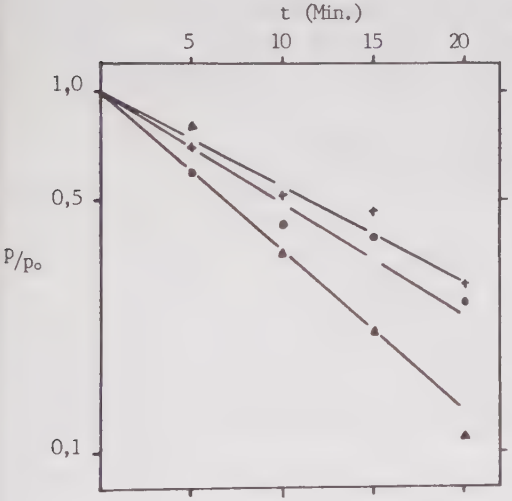

Abb. 14

T2-Adsorption an den Stamm 1024

Zelldichte: 5×10^8/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (250 µg/Ansatz)
+ mit AJ235-Ak (250 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG	$4{,}19 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}
mit AJ235-Ak	$3{,}86 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

Durch die AJ235-Antikörper wird die Adsorption der T2-Phagen an den Stamm 1024 etwa um den Faktor 1,1 vermindert. Diese Abweichung ist so gering, daß man nicht mehr von einer Behinderung der Adsorption sprechen kann.

Die Hemmung der T2-Adsorption an den Stamm H 315 ist also auf eine sterische Behinderung durch die an den FhuA-Rezeptor gebundenen AJ235-Antikörper zurückzuführen.

3.3.21. Kinetik der T6-Phagenadsorption (Stamm W 3110)

Da die Adsorption der T2-Phagen sterisch durch die Bindung von Antikörpern an den FhuA-Rezeptor gehemmt wird, war es interessant zu überprüfen, ob auch die Adsorption anderer Phagen gehemmt wird.

Der T6-Phage benutzt das in relativ wenig Kopien (etwa 10^4) vorkommende Tsx-Genprodukt als Rezeptor.

Der Stamm W 3110 wurde bis zur OD 0,5 in TY-Medium angezogen. Die Zelldichte im Test betrug $1,7 \times 10^8$/ml. Die Inkubationen erfolgten in NB-Medium mit 1% NaCl. Deshalb wurden die MausIgG in NB-Medium aufgenommen und die AJ235-Antikörper 1:1 in doppelt konzentriertem NB-Medium verdünnt.
Die Vorinkubation erfolgte für 30 Min. bei 37°C. Ausplattiert wurde auf dem Stamm W 3110.
Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt.

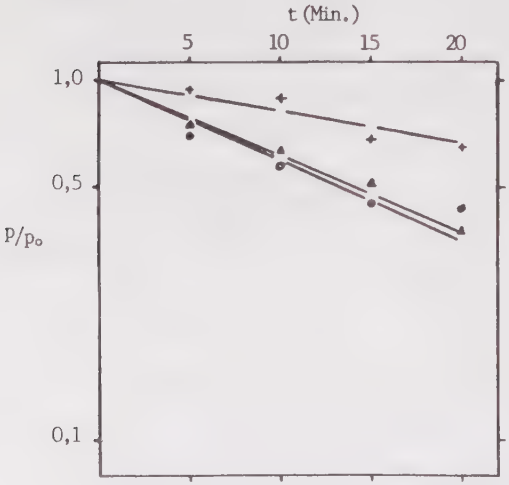

Abb. 15

T6-Phagenadsorption an den Stamm W 3110

Zelldichte: $1,7 \times 10^8$/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit NB-Medium
○ Kontrolle mit MausIgG (125 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (125 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $2,86 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $1,21 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

Durch die AJ235-Antikörper wird die Adsorptionskonstante der T6-Phagen an den Stamm W 3110 etwa um den Faktor 2,4 vermindert.

3.3.22. Kinetik der T6-Phagenadsorption (Stamm 72-6)

Auch hier wurde untersucht, ob die verminderte Adsorption der T6-Phagen auch dann noch auftritt, wenn eine fhuA-Mutante für den Test eingesetzt wird. Der Stamm 72-6 ist fhuA.

Der Test mit dem Stamm 72-6 wurde genau wie die Kinetik der T6-Adsorption mit dem Stamm W 3110 durchgeführt. Es wurde auch auf dem Stamm W 3110 ausplattiert.
Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt.

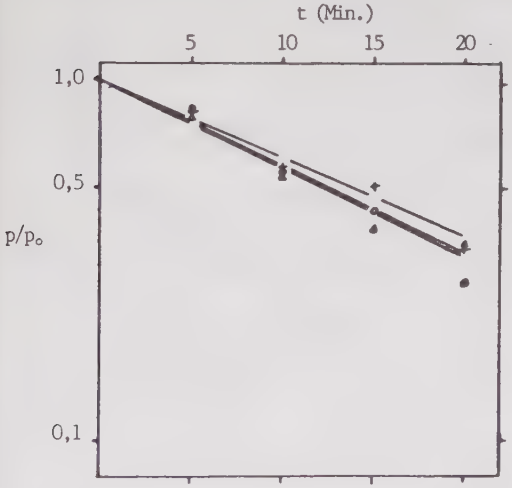

Abb. 16

T6-Phagenadsorption an den Stamm 72-6

Zelldichte: $1{,}7 \times 10^8$/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit NB-Medium
○ Kontrolle mit MausIgG (125 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (125 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $3{,}28 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $3{,}04 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

Die Adsorption der T6-Phagen an den Stamm 72-6 wird durch die AJ235-Antikörper etwa um den Faktor 1,1 vermindert. Dieser Unterschied ist so gering, daß man nicht mehr von einer Behinderung der T6-Adsorption sprechen kann.
Die Hemmung der T6-Adsorption an den Stamm W 3110 erfolgt aufgrund einer sterischen Hinderung durch an den FhuA-Rezeptor gebundene AJ235-Antikörper.

3.3.23. Kinetik der TuIb-Phagenadsorption (Stamm W 3110)

Zur Überprüfung der Ergebnisse der T2- und T6-Kinetiken wurde auch die TuIb-Phagenadsorption in Abhängigkeit von den AJ235-Antikörpern untersucht. Der TuIb-Phage benutzt das OmpC-Protein (Hauptprotein Ib, etwa 10^5 Kopien/Zelle) als Rezeptor.

Der Test wurde mit dem Stamm W 3110 durchgeführt, der bis zu einer OD 0,5 angezogen worden war. Im Test betrug die Zelldichte $1,7 \times 10^8$/ml. Die Vorinkubation erfolgte für 30 Min. bei 37°C. Ausplattiert wurde auf W 3110. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

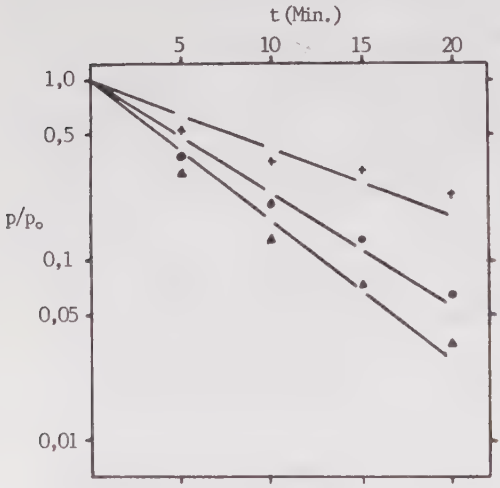

Abb. 17

TuIb-Phagenadsorption an den Stamm W 3110

Zelldichte: $1,7 \times 10^8$/ml

Phagen: 5×10^6 pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (125 µg/Ansatz)
+ mit AJ235-Ak (125 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG	$7,84 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}
mit AJ235-Ak	$4,92 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

Die Adsorption der TuIb-Phagen an den Stamm W 3110 wird durch die AJ235-Antikörper etwa um den Faktor 1,6 vermindert.

3.3.24. Kinetik der TuIb-Phagenadsorption (Stamm 72-6)

Wie bei der T6-Adsorption wurde die Beeinflussung der TuIb-Adsorption durch AJ235-Antikörper auch an einer fhuA-Mutante untersucht (Stamm 72-6).

Der Test wurde genau wie die TuIb-Adsorption mit dem Stamm W 3110 durchge-

führt. Es wurde auf W 3110 ausplattiert.
Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.

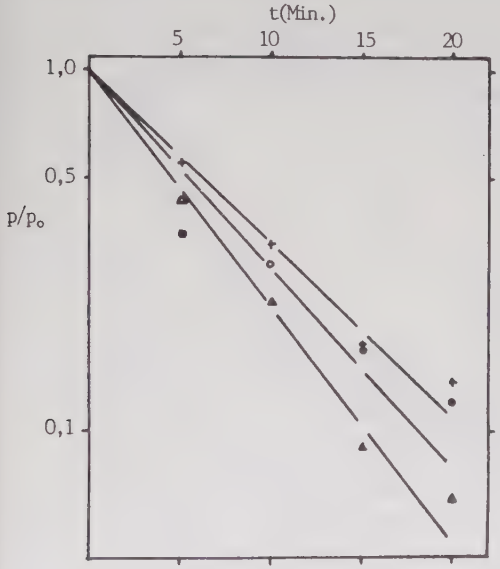

Abb. 18

TuIb-Phagenadsorption an den Stamm 72-6

Zelldichte: $1,7 \times 10^8$/ml

Phagen: 5×10^6 pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (125 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (125 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $7,08 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $6,76 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

Die Adsorption der TuIb-Phagen an den Stamm 72-6 wird durch die AJ235-Antikörper praktisch nicht behindert. Also erfolgte die Hemmung der TuIb-Adsorption an den Stamm W 3110 auch aufgrund sterischer Behinderung.

3.3.25. Kinetik der T1-Phagenadsorption (Stamm HO 831)

Der T1-Phage benötigt wie der T5-Phage den FhuA-Rezeptor zur Bindung an die Zelle. Zusätzlich benötigt er noch das TonB-Genprodukt.
Da die Adsorption der T5-Phagen durch die AJ235-Antikörper stark gehemmt wird, war es interessant zu überprüfen, ob auch die Adsorption anderer Phagen, die den gleichen Rezeptor benutzen, gehemmt wird.

Für den Test wurde der Stamm HO 831 eingesetzt, der bis zu einer OD 0,5 bei 30°C in TY-Medium mit 0,2% Glukose und 50 µg Neomycin/ml angezogen worden war.

Die Zelldichte im Test betrug $8,5 \times 10^8$/ml. Die Vorinkubation erfolgte für 30 Min. bei 37°C. Da die Mausimmunglobuline die Adsorption der T1-Phagen völlig verhinderten, wurde als Kontrolle BSA in entsprechender Konzentration eingesetzt.
Die nicht adsorbierten Phagen wurden auf AB 2847 ausplattiert.
Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt.

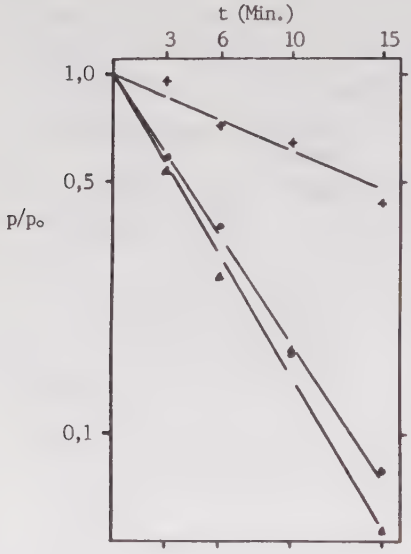

Abb. 19
T1-Phagenadsorption an den Stamm HO 831
Zelldichte: $8,5 \times 10^8$/ml
Phagen: 5×10^6pfu/ml
Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit BSA (125 µg/Ansatz)
+ mit AJ235-Ak (125 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit BSA $2,16 \times 10^{-10}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $5,68 \times 10^{-11}$ ml x Min^{-1}

Die Adsorption der T1-Phagen an den Stamm HO 831 wird durch die AJ235-Antikörper um den Faktor 3,8 vermindert.

3.3.26. Kinetik der ø80-Phagenadsorption (Stamm HO 831)

Der ø80-Phage benutzt ebenfalls den FhuA-Rezeptor zur Infektion der Zelle und benötigt wie der T1-Phage zusätzlich das TonB-Genprodukt.

Bei dem Test wurde der Stamm HO 831 verwendet, der wie für den T1-Phagenbindungstest angezogen worden war.
Die Zelldichte im Test war $2,5 \times 10^9$/ml. Die Vorinkubation erfolgte für 30

Min. bei 37°C. Als Indikatorstamm wurde W 3110 eingesetzt.
Das Ergebnis ist in Abb. 20 dargestellt.

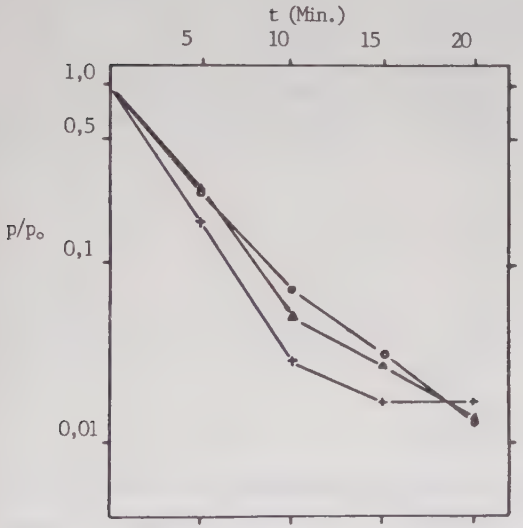

Abb.20

ø80-Phagenadsorption an den Stamm HO 831

Zelldichte: $2,5 \times 10^9$/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml

Ansatz: 100 µl

△ Kontrolle mit PBS
○ Kontrolle mit MausIgG (125 µg/Ansatz)
\+ mit AJ235-Ak (125 µg/Ansatz)

Aus der Kinetik ließen sich die Adsorptionskonstanten berechnen:

mit MausIgG $4,61 \times 10^{-11}$ ml x Min^{-1}

mit AJ235-Ak $5,34 \times 10^{-11}$ ml x Min^{-1}

Die Adsorption der ø80-Phagen an den Stamm HO 831 wird durch die AJ235-Antikörper nicht behindert. Sie ist etwa um den Faktor 1,2 besser als bei der Kontrolle mit MausIgG und bei der PBS-Kontrolle.

3.3.27. Zusammenfassung der Ergebnisse der Phagenadsorptionskinetiken

Ein Maß für die Verhinderung der Phagenadsorption durch AJ235-Antikörper ist das Verhältnis der Adsorptionskonstante mit MausIgG (bzw. BSA) zur Adsorptionskonstante mit AJ235-Antikörper. Das ist in der Tab. 11 dargestellt.

Aus der Tab. 11 geht hervor, daß die AJ235-Antikörper die Adsorption der T5- und der T1-Phagen an den FhuA-Rezeptor stark hemmen. Die Adsorption des ø80-Phagen, der ebenfalls den FhuA-Rezeptor benötigt, wird nicht gehemmt.
Die Adsorption der Phagen T2, T6 und TuIb an ihren jeweiligen Rezeptor wird durch die Antikörper nur auf fhuA$^+$-Stämmen gehemmt.

Tab. 11

Ergebnisse der Phagenadsorptionskinetiken

(die Werte geben den Quotienten K_{ads}(MausIgG) / K_{ads}(AJ235-Ak) an)

Phagen	*Escherichia coli* K-12-Stämme				
	W 3110 Wildtyp	HO 831 *fhuA*^{C}	H 315 *ompC*	72-6 *ompF fhuA*	1024 *fhuA*::Tn*10*
T5	3,5	6,8			
T1		3,8			
ø80		0,9			
T2			1,8		1,1
T6	2,4			1,1	
TuIb	1,6			1,0	

3.3.28. Colicin M-Test (Stamm W 3110)

Durch die AJ235-Antikörper wurde die Adsorption der T5- und der T1-Phagen deutlich gehemmt. Es war daher interessant, ob auch die Aufnahme eines anderen Substrats des FhuA-Rezeptors durch diese Antikörper behindert wird.

Ein geeignetes Substrat war das Colicin M. Colicin M tötet die Zellen ab. Blockieren die AJ235-Antikörper auch die Bindungsstelle des Colicins M, sollten die Bakterien vor der toxischen Wirkung geschützt sein.

Der Test wurde mit dem Stamm W 3110 wie beschrieben (2.2.33. Methode 2) durchgeführt. Eine Colicin M-Lösung wurde von R. Dreher zur Verfügung gestellt. In einer Probekinetik wurde die Verdünnung bestimmt, die nach 20 Min. Inkubation bei 37°C mehr als 90% der Zellen abgetötet hatte. Diese Verdünnung wurde für die Tests eingesetzt.
Es wurde 15 Min. bei 37°C mit 100 µg AJ235-Antikörper/Ansatz und zur Kontrolle mit 100 µg BSA/Ansatz vorinkubiert. Nach Zugabe der Colicin M-Lösung wurden zu den entsprechenden Zeiten Proben entnommen und auf TY-Platten ausplattiert.
Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt.

Beim Ansatz mit BSA sind 50% der Zellen bereits nach 2,5 Min. abgetötet. Beim Ansatz mit AJ235-Antikörpern sind 50% der Zellen erst nach 9,5 Min. abgetötet.

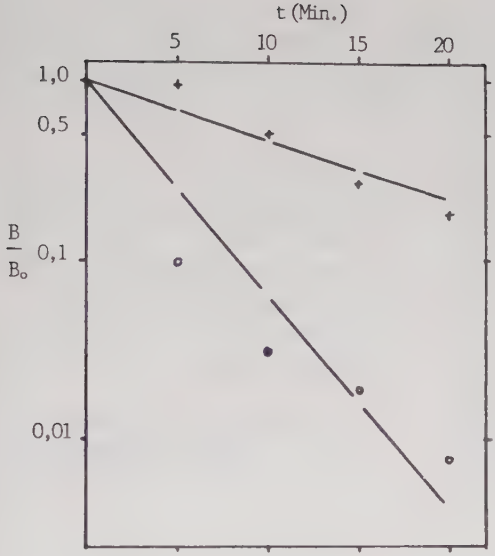

Abb. 21

Wirkung von Colicin M auf den Stamm W 3110

Zelldichte: $3{,}5 \times 10^7$/ml

Colicin M-Titer: siehe Text

Ansatz: 100 µl

o mit BSA (100 µg/Ansatz)
+ mit AJ235-Ak (100 µg/Ansatz)

B : Bakterien zur Zeit t
B_o : Bakterien zur Zeit t_o

Die Abtötungsgeschwindigkeit wird durch die AJ235-Antikörper etwa um den Faktor 3,8 vermindert.

3.3.29. Colicin B-Test (Stamm W 3110)

Colicin B gelangt über den FepA-Rezeptor in die Zelle. Um zu prüfen, ob die AJ235-Antikörper eventuell Colicine inaktivieren, wurde der Test mit dem Colicin B wiederholt.

Dieser Test wurde ebenfalls mit dem Stamm W 3110 durchgeführt. Eine Colicin B-Lösung wurde von E. Maas zur Verfügung gestellt. In einer Probekinetik wurden für diesen Test geeignete Verdünnungen bestimmt.

Da Colicin B in höherer Konzentration sehr schnell die Zellen abtötet, wurde auch eine 2. stärkere Verdünnung eingesetzt, die nach 20. Min. Inkubation erst etwa 60-70% der Zellen abtötete.
Die Vorinkubation mit BSA und AJ235-Antikörpern erfolgte für 15 Min. bei 37°C. Die Überlebenden wurden auf TY-Platten ausplattiert.
Die Ergebnisse sind in Abb. 22 und 23 dargestellt.

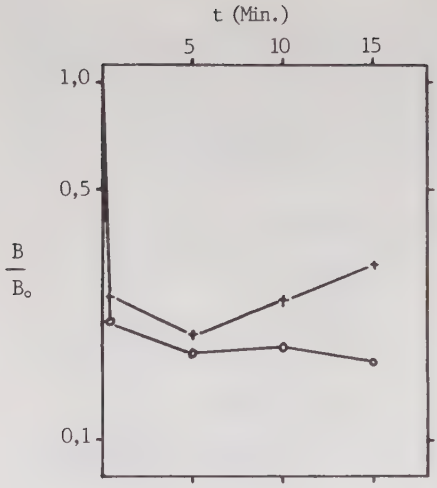

Abb. 22

Wirkung von Colicin B auf den Stamm W 3110

Zelldichte: $3,5 \times 10^7$/ml

Colicin B-Titer: 1. Verd., siehe Text

Ansatz: 100 µl

o mit BSA (100 µg/Ansatz)
+ mit AJ235-Ak (100 µg/Ansatz)

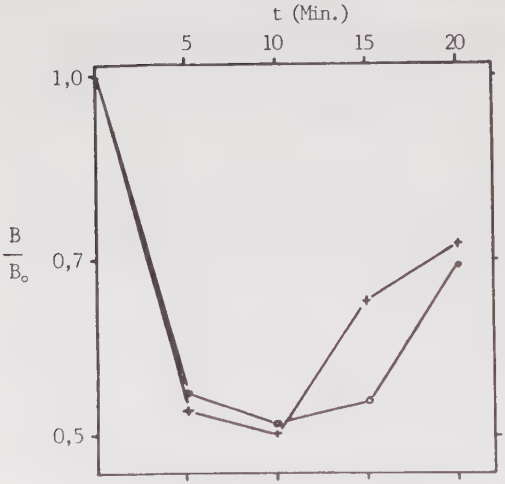

Abb. 23

Wirkung von Colicin B auf den Stamm W 3110

Zelldichte: $3,5 \times 10^7$/ml

Colcin B-Titer: 2. Verd., siehe Text

Ansatz: 100 µl

o mit BSA (100 µg/Ansatz)
+ mit AJ235-Ak (100 µg/Ansatz)

Bei beiden Ansätzen mit dem höheren Colicin B-Titer waren unabhängig von der Vorinkubation 50% der Zellen in weniger als 0,5 Min. abgetötet worden.

Bei den Ansätzen mit dem niedrigeren Colicin B-Titer waren unabhängig von der Vorinkubation 50% der Zellen nach etwa 14 Min. abgetötet worden.

Aus diesem Colicin B-Kontrollversuch kann man den Schluß ziehen, daß durch die Inkubation mit den AJ235-Antikörpern die Colicine nicht inaktiviert wer-

den.

Die AJ235-Antikörper blockieren also den FhuA-Rezeptor so, daß das Colicin M nur erschwert in die Zelle gelangen kann.

4. Diskussion

4.1. Hybridomalinie D141

Die zur Fusion verwendeten Milzzellen, aus der die Linie D141 hervorging, stammten aus einer Maus, die mit einer Proteinlösung immunisiert worden war, die den FhuA-Rezeptor angereichert enthielt. Es lag deshalb nahe, diese Lösung auch als Antigen beim Screening mit dem Radioimmunassay einzusetzen. Dieses Screening war auch erfolgreich. Eine positive Antwort im Radioimmunassay sagt aber noch nichts Näheres über die Antigenspezifität der entsprechenden Antikörper aus, da mehrere Proteine in dieser Lösung enthalten waren (Abb. 1).

Da besonders nach FhuA-spezifischen Antikörpern gesucht wurde, wurde ein Agglutinationstest mit $\underline{fhuA}^+$- und $\underline{fhuA}^-$-Stämmen durchgeführt. FhuA-spezifische Antikörper sind nur in der Lage $\underline{fhuA}^+$-Stämme zu agglutinieren.

Der Agglutinationstest war auch nach Optimierung der Inkubationsbedingungen (Zelldichte, Puffer, Detergens) relativ störanfällig. Es gab oft schon Agglutinationen der Zellen ohne Zugabe von Antikörpern, bzw. allein durch Zugabe des zweiten Kaninchen-anti-MausIgG-Antikörpers. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, mußten deshalb immer Kontrollen mit Überstand der NS-1-Zellinie (Myelomalinie, die zur Fusion eingesetzt wurde) und nur mit dem Kaninchen-anti-MausIgG-Antiserum (2. Antikörper zur Verstärkung der Agglutination) gemacht werden.

Aus diesem Test wurde der Hinweis auf eine FhuA-Spezifität der Antikörper der D141-Zellinie erhalten.

Ein weiterer "in vivo"-Test zur Überprüfung der FhuA-Spezifität der D141-Antikörper war die Untersuchung der T5-Adsorption. Durch an das FhuA-Protein gebundene Antikörper sollte dieser für die Adsorption der T5-Phagen notwendige Rezeptor blockiert sein. Eine Hemmung der T5-Phagenadsorption durch die D141-Antikörper konnte deutlich gezeigt werden.

Durch einen entsprechenden Versuch mit BF23-Phagen konnte nachgewiesen werden, daß die Antikörper die Adsorption dieser Phagen nicht verhindern. Die Beeinflussung der T5-Phagenadsorption ist demnach nicht auf eine Phageninaktivierung durch Kulturüberstand zurückzuführen. Wäre es so, hätten auch die den T5-Phagen sehr ähnlichen BF23-Phagen (64) inaktiviert werden müssen.

Desweiteren wurde damit gezeigt, daß die Oberfläche von Escherichia coli nicht unspezifisch durch die Antikörper abgedeckt wird.

Durch die D141-Antikörper wird die Zahl der überlebenden Zellen nach Inkubation mit Colicin M stark erhöht. Colicin M ist ein von bestimmten E. coli-Stämmen produziertes Toxin. Es wird durch ein Plasmid kodiert und ist ein Protein mit dem Molekulargewicht 27 kd. Colicin M gelangt über den FhuA-Rezeptor in die Zelle. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht völlig geklärt. Es greift in die Mureinbiosynthese ein. Schon nach kurzer Inkubationszeit (weniger als 20 Min.) ruft es irreversible Schäden der Zelle hervor (17). Die Schutzwirkung durch die Antikörper ist also auf die Blockierung des FhuA-Rezeptors für das Colicin M zurückzuführen.

Ein entsprechender Versuch mit Colicin B, das über den FepA-Rezeptor in die Zelle gelangt, ebenfalls plasmidkodiert ist und nach kurzer Zeit die Zellen irreversibel schädigt, zeigte, daß die Antikörper nicht die Colicine inaktivieren.

Da diese biologischen Tests alle relativ aufwendig sind, wurde versucht, das Immunoblotting zum Screening zu verwenden.

Die Methodik und die bei der Anwendung des Verfahrens aufgetretenen Schwierigkeiten werden in 4.4. diskutiert.

Bei den Blotting-Inkubationen wurden zusätzlich zu den in der Kontrolle markierten Banden zwei Banden durch Substratumsatz deutlich angefärbt (Abb. 3). Diese Banden liegen im Bereich 70-80 kd. Bei der oberen Bande handelt es sich entweder um das FhuA-Protein (78 kd) oder um das FhuE-Protein. Letzteres, ein 76 kd-Protein, ist für die Eisenaufnahme über Coprogen notwendig (31). Das zweite deutlich angefärbte Protein ist auf dem mit Amidoschwarz gefärbten Streifen durch das Cir-Protein (74 kd) verdeckt. Von diesem Protein, das normalerweise nicht in der SDS-PAGE sichtbar ist, ist keine Funktion bekannt (9). Es könnte sich um das Abbauprodukt des Enterochelin-Rezeptors (FepA, 81 kd) handeln, das in (21) beschrieben wurde.
Verstärkt wird nach der Inkubation mit D141-Antikörpern auch die Anfärbung des FecA-Proteins (80,5 kd).

Beim Immunoblot werden durch die D141-Antikörper also vor allem drei Proteine angefärbt (Abb. 3). Eines dieser Proteine könnte FhuA sein. Weiter binden die monoklonalen Antikörper an den FecA-Rezeptor und ein noch nicht funktionell charakterisiertes, etwa 74 kd großes Protein. Diese Proteine

müssen gemeinsame Sequenzen haben, gegen die die D141-Antikörper gerichtet sind.

FhuA (oder auch FhuE) und FecA sind Proteine, die für die Eisenaufnahme gebraucht werden. Eventuell steht ihre funktionelle Verwandtschaft im Zusammenhang mit ihrer strukturellen Verwandtschaft (identische antigene Determinanten). Vielleicht hat auch deshalb das 74 kd-Protein eine Funktion beim Eisentransport.

Die Versuche mit D141-Antikörpern wurden ausschließlich mit dem Überstand der Hybridomalinie gemacht. Es wurde versucht, die Antikörper mittels Natriumsulfat-Fällung zu isolieren. Die isolierten Antikörper hatten allerdings keine Aktivität mehr. Eine Isolierung über Protein A-Sepharose war nicht möglich. Die schweren Ketten der D141-Antikörper haben die Subklasse IgG_1. Die Bindung von Protein A an den Fc-Teil vom Maus-IgG_1-Antikörpern ist sehr labil, d.h. ein Großteil der Immunglobuline wird nicht auf der Affinitätssäule gebunden (27).

Aus den Versuchen mit den Überständen der D141-Zellinie lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1) Die D141-Antikörper reagieren mit dem FhuA-Rezeptor, der auf der Oberfläche des Bakteriums exponiert ist.

2) Dieser exponierte Teil des FhuA-Rezeptors ist notwendig für die Aufnahme des Colicins M und die Adsorption des Phagens T5.

3) Diese Proteinsequenz wird von den Antikörpern auch auf folgenden denaturierten Proteinen erkannt: FhuA (oder FhuE), FecA und einem mit Cir gleichlaufenden 74 kd-Protein.

4.2. Hybridomalinie K53

Da die Fusion K mit Milzzellen einer Maus, die mit abgetöteten AB 2847-Zellen immunisiert worden war, durchgeführt wurde, konnte man erwarten, daß die entstandenen Hybridomalinien vor allem Antikörper gegen native Proteine an der Oberfläche der Bakterienzelle produzieren.

Deshalb wurde die Antikörperproduktion auch mit Hilfe des Agglutinationstests mit dem Stamm AB 2847 überprüft. 36 der 60 entstandenen Linien waren in der Lage, Zellen dieses Stammes zu agglutinieren. Dieser Test lieferte aber noch keine Aussage über die Spezifität der Antikörper.

Um diese zu bestimmen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei wurde der Hinweis auf eine OmpA(II*)-Spezifität der K53-Antikörper erhalten. Von den anderen 35 Linien der Fusion konnten mit den Immunpräzipitationen keine Antigenspezifitäten bestimmt werden.

Es gab technische Schwierigkeiten. Da die Präzipitationen mit Zellkulturüberstand (10 ml/Ansatz) durchgeführt wurden, überdeckten Proteine aus dem im Überstand enthaltenen FCS (z.B Serumalbumin) einige Bereiche des Gels, so daß einige der nicht markierten bakteriellen Membranproteine nicht mehr sichtbar waren. Zudem gab es unspezifische Präzipitationen von einigen Membranproteinen allein durch Zugabe des Überstandes der NS-1(Myeloma)-Zellinie. Wenn Antikörper gegen diese überdeckten oder unspezifisch präzipitierten Membranproteine gerichtet waren, konnte ihre Spezifität nicht erkannt werden. Desweiteren wurden durch die SDS-Solubilisierung der Membranproteine ihre antigenen Determinanten z.T. sicher zerstört. D.h. Antikörper, die gegen native Proteine gerichtet waren, konnten denaturierte Proteine nicht präzipitieren.

Vom sogenannten "hitzelabilen" OmpA-Protein ist bekannt, daß es seine antigenen Determinanten auch nach SDS-Denaturierung weitgehend bewahrt (36).

Die Spezifität der K53-Antikörper wurde durch weitere biologische Tests überprüft.

Zunächst wurde untersucht, ob die K53-Antikörper auch in der Lage sind, Zellen eines Stammes zu agglutinieren, dem das OmpA-Protein fehlt. K53-Antikörper konnten Zellen dieses Stammes (PL 6) im Gegensatz zu D141-Antikörpern (FhuA-spezifisch) nicht agglutinieren. Damit war ein weiterer Hinweis auf die OmpA-Spezifität der K53-Antikörper gegeben.

Das OmpA-Protein ist Rezeptor für die Phagen TuII* und K3 (82). Wenn Antikörper gegen dieses Protein gerichtet sind, sollten sie in der Lage sein, daß Protein so abzudecken, daß es nicht mehr als Phagenrezeptor fungieren kann.

Die Ergebnisse zeigten eine solche Hemmwirkung bei beiden genannten Phagen. Der TuII*- sowie der K3-Phage haben beide schlecht an den Stamm AB 2847 adsorbiert. Dennoch war die Hemmung realativ deutlich. Wahrscheinlich hätte die Phagenadsorption durch eine größere Bakteriendichte im Testansatz verbessert werden können. Bei einer höheren Zelldichte hätten aber die Antikörper im Kulturüberstand nicht mehr zur Abdeckung der Proteine ausgereicht.

Die Isolierung der in relativ niedriger Konzentration in den Kulturüberständen vorkommenden K53-Antikörper (2-5 µg/ml) war wie bei den D141-Antikörpern nicht möglich. Die schweren Ketten der K53-Antikörper hatten die Subklasse IgG_1, die nur sehr schwach von Protein A gebunden wird.

Aufgrund des geringen Antikörpertiters und der Unmöglichkeit, die Antikörper zu isolieren, konnte Hinweisen, daß die K53-Antikörper auch die Adsorption der T5-Phagen an den FhuA-Rezeptor behindern, nicht weiter nachgegangen werden.

Diese Hemmung würde eher auf eine räumliche Nachbarschaft der Proteine FhuA und OmpA hindeuten als auf gemeinsame Antigendeterminanten. Bei gemeinsamen Antigendeterminanten hätten die K53-Antikörper auch die Zellen des ompA-Stammes, der das FhuA-Protein hat, agglutinieren müssen.

Eine Reduktion des FhuA-abhängigen Ferrichromtransports wurde in ompA-Mutanten früher schon beobachtet (15).

Aus den Ergebnissen läßt sich zusammenfassend festhalten:

1) Die K53-Antikörper erkennen eine Sequenz des OmpA-Proteins, die auf der Oberfläche der Zelle zugänglich ist.

2) Diese Sequenz bleibt auch nach SDS-Denaturierung des Proteins für die Antikörper erkennbar.

3) Dieser Teil des OmpA-Proteins ist für die Bindung der Phagen TuII* und K3 notwendig.

4.3. Hybridomalinie AJ235

Die Fusion AJ wurde mit Milzzellen einer Maus durchgeführt, die zuvor mit einer Membranpräparation des Stammes H 1426 immunisiert worden war.

Die entstandenen 73 Klone wurden im Enzymimmunassay auf ihre Antikörperproduktion getestet. Die Testplatten waren mit der H 1426-Membranpräparation beschichtet worden. Mit 11 Linien wurden z.T. sehr starke Antworten erhalten.

Da eine starke Immunantwort auf bakterielle Antigene die Vermutung nahelegt, daß diese durch das stark immunogen wirkende LPS hervorgerufen wurde (46), mußte untersucht werden, ob die Antikörper gegen LPS gerichtet waren.

In den zur Lösung dieser Frage verwendeten Enzymimmunassays konnte eindeutig

gezeigt werden, daß die Reaktion der Antikörper mit Proteinen der äußeren Membran wesentlich stärker war als mit LPS. Damit war gezeigt, daß die Antikörper der AJ235-Zellinie (starker Antikörperproduzent) mit einem Protein der äußeren Membran reagieren, allerdings nicht mit welchem.

Es wurde versucht, diese Frage mit Hilfe des Agglutinationstests zu lösen. Die starke Reaktion legte nahe, daß es sich eventuell um Antikörper gegen Hauptproteine handelte. Deshalb wurden im Test neben einem Kontrollstamm (AB 2847) drei Stämme mit Mutationen in den Hauptproteinen eingesetzt.

Die AJ235-Antikörper waren nicht in der Lage, Zellen des Stammes 72-6 zu agglutinieren. Diesem Stamm fehlen das OmpF- und das FhuA-Protein. Da die Antikörper aber Zellen des Stammes JW 030 agglutinierten, dem ebenfalls das OmpF-Protein fehlt, konnte man vermuten, daß es sich um FhuA-spezifische Antikörper handelt. Mit diesem Test war aber eine OmpF-Spezifität noch nicht völlig auszuschließen. Der Stamm JW 030 exprimiert das PhoE-Protein, das dem OmpF-Protein sehr ähnlich ist (66).

Das Ergebnis der Agglutinationstests konnte mit Enzymimmunassays, bei denen mit ganzen Zellen der entsprechenden Stämme beschichtet worden war, bestätigt werden. Diese Methode hat den Vorteil, daß quantitative Aussagen durch photometrische Bestimmung des umgesetzten Substrats gemacht werden können.

Da die AJ235-Zellinie Antikörper der Subklasse IgG_{2b} produzierte, war es möglich, diese über Protein A-Sepharose zu isolieren.

Bei der Isolierung wurden elektrophoretisch reine Antikörper erhalten. Aus 200 ml Überstand ließen sich 5 mg reine Antikörper gewinnen. In 1 ml Überstand waren also mindestens 25 µg Antikörper enthalten - ein relativ hoher Wert (ø 2-50 µg Antikörper / ml Hybridomakulturüberstand). Ein hoher Antikörpertiter war auch aufgrund der starken Reaktion im Enzymimmunassay zu erwarten. Die Antikörper behielten nach der Isolierung ihre volle Aktivität, wie durch Tests gezeigt wurde.

Um die Antigenspezifität der AJ235-Antikörper nachzuweisen, wurden viele Experimente mit dem Immunoblotting gemacht (siehe auch 4.4.). Es ist nicht gelungen, mit Hilfe dieses Verfahrens die Spezifität nachzuweisen. Ein leichter Substratumsatz trat immer schon durch die Inkubation mit dem markierten 2. Antikörper auf. Zusätzlich sah man, wenn zuvor mit AJ235-Antikörpern inkubiert worden war, eine leicht verstärkte Anfärbung der Eisenproteine im Bereich 70-85 kd und der Hauptproteine im Bereich 30-40 kd (siehe Abb. 8).

Mit den Immunpräzipitationen, die mit den isolierten Antikörpern und ^{14}C-markierten Membranen durchgeführt wurden, um die bei den Immunpräzipitationen mit den K53-Antikörpern aufgetretenen Schwierigkeiten zu vermeiden, konnte ebenfalls keine Aussage über die Antigenspezifität gemacht werden.

Bei diesen Tests wurden vor allem die Membranproteine ausgefällt, die in hoher Kopienzahl auftreten. Auch bei der Solubilisierung mit Octylglucosid, bei der die native Struktur der Proteine weitgehend erhalten bleiben soll, wurden die gleichen Proteine präzipitiert. Eventuell werden bei dieser Solubilisierung die Membranproteine nicht vollständig vom Murein abgelöst, so daß bei Bindung der Antikörper an ein Protein andere mitgerissen werden.

Zur näheren Charakterisierung der Antigenspezifität mußten also Funktionstests durchgeführt werden.

Mit dem Agglutinationstest und dem Enzymimmunassay waren Hinweise auf eine FhuA-Spezifität der AJ235-Antikörper erhalten worden. Durch Adsorptionskinetiken mit T5-Phagen wurde gezeigt, daß die Adsorptionskonstante an den Stamm W 3110 (Wildtyp) durch die AJ235-Antikörper um den Faktor 3,5 vermindert wird. Diese Konstante wird bei einem FhuA-Überproduzenten (HO 831) durch Antikörper sogar um den Faktor 6,8 vermindert. Dieser noch stärkere Effekt ist sicher auf die bessere Adsorption der T5-Phagen an diesen Stamm zurückzuführen. Da dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp eine stark veränderte Zusammensetzung der äußeren Membran aufweist, sind die Antikörper eventuell besser in der Lage, die Rezeptoren abzudecken.

Phagenadsorptionskinetiken wurden auch mit den Phagen T1 und ø80 durchgeführt. Es wurde wieder der Stamm HO 831 eingesetzt, an den auch die Adsorption dieser Phagen sehr gut war. Die Adsorptionskonstante des T1-Phagens konnte durch AJ235-Antikörper stark (Faktor 3,8),die des ø80-Phagens nicht (Faktor 0,9) vermindert werden. Daraus kann man schließen, daß die AJ235-Antikörper eine Domäne des FhuA-Rezeptors abdecken, die für die Adsorption der Phagen T1 und T5, nicht aber für die Adsorption des ø80-Phagen notwendig ist.

Die gleiche Domäne des FhuA-Rezeptors wird auch für die Aufnahme des Colicins M gebraucht. Denn durch Vorinkubation der Zellen mit Antikörpern wurde die Abtötungsrate um den Faktor 3,8 verringert.

Entsprechende Experimente mit Albomycin scheiterten daran, daß dieses Antibiotikum nicht bakteriozid, sondern nur bakteriostatisch wirkt.

In Adsorptionskinetiken mit den Phagen T2, T6 und TuIb verminderten die AJ235-Antikörper die Adsorptionskonstanten durchschnittlich um den Faktor 2. Diesen Effekt konnten die Antikörper nicht hervorrufen, wenn der verwendete Stamm keinen FhuA-Rezeptor in der Membran aufwies. Die Hemmwirkung auf die T2-, T6- und TuIb-Adsorption ist also nicht auf eine Wechselwirkung der Antikörper mit den entsprechenden Phagenrezeptoren (OmpF, Tsx, OmpC) zurückzuführen. Es muß sich um eine sterische Hinderung handeln.

Die verwendeten Wildtypzellen (W 3110) enthalten etwa 1.000 bis 10.000 FhuA-Rezeptoren pro Zelle.

Eine Escherichia coli-Zelle hat etwa eine Oberfläche von 8×10^6 nm² (bei einer angenommenen Länge von 3 µm und einem Durchmesser von 0,8 µm).

Ein IgG-Antikörper kann etwa eine Fläche von 40 bis maximal 80 nm² abdecken (81).

Bei maximal 10.000 FhuA-Rezeptoren pro Zelle kann also durch entsprechende Antikörper höchstens 5-10 Prozent der Oberfläche des Bakteriums abgedeckt werden.

Bei einer statistischen Verteilung aller Proteine in der Membran hätten demnach diese Hemmwirkungen nicht auftreten können. Man muß deshalb annehmen, daß die aktiven Phagenrezeptoren als "Cluster" vorkommen. Eine entsprechende Theorie wurde schon 1968 von Bayer aufgestellt (3). Nur so ist bei einer nicht vollständigen Abdeckung der Membran zu erklären, daß die FhuA-spezifischen Antikörper auch die Adsorption der T2-, T6- und TuIb-Phagen hemmen können.

Die Adsorption der ø80-Phagen wird durch die Antikörper nicht beeinflußt. Es wäre möglich, daß dieser Phage an FhuA-Rezeptoren bindet, die sich außerhalb dieser "Cluster" befinden.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

1) Die AJ235-Antikörper erkennen eine Antigendeterminante auf der Oberfläche des nativen FhuA-Proteins, die durch SDS-Denaturierung zerstört wird.

2) Diese Determinante ist notwendig für die Adsorption der Phagen T1 und T5, sie ist nicht notwendig für die ø80-Adsorption.

3) Über die gleiche Domäne gelangt auch das Colicin M in die Zelle.

4) Die Phagen T2, T6 und TuIb werden durch die FhuA-spezifischen Antikörper nur auf fhuA$^+$-Stämmen gehemmt. Das deutet auf das Vorliegen der aktiven Rezeptoren als "Cluster" in der Membran hin.

5) Die AJ235-Antikörper binden mit geringer Affinität an einen Großteil der denaturierten Membranproteine.

4.4. Immunoblotting

Um eine gute Auftrennung der Proteine der äußeren Membran von Escherichia coli in der Gelelektrophorese zu erreichen, müssen sie zuvor durch Erhitzen in SDS-Puffer solubilisiert werden.

Der sich an diese SDS-PAGE anschließende Schritt ist das eigentliche Blotting. Bei der elektrophoretischen Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran traten keine nennenswerten Schwierigkeiten auf. In drei Stunden wurden sämtliche Proteine in ausreichender Menge transferiert. Beim Transfer durch Diffusion nach Southern (77), der nur anfangs angewandt worden war, traten Probleme mit der Übertragung hochmolekularer Proteine (größer 50 kd) auf. Dieses Verfahren war zudem sehr zeitaufwendig.

Da die Nitrocellulose eine hohe Proteinbindungskapazität hat, mußte die freie Kapazität durch Inkubation mit Rinderserumalbumin oder fötalem Kälberserum abgesättigt werden.

Zur Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern und den 2. markierten Antikörpern mußte zur Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen der Proteine ein Detergens (Triton X-100) zugesetzt werden. Durch verlängerte Inkubation wurde die unspezifische Bindung verstärkt.

Das größte Problem stellten die zweiten Antikörper dar. Es wurden sowohl Kaninchen- als auch Ziegen-anti-MausIgG-Antikörper eingesetzt. Überall, auch bei den später verwendeten F(ab')$_2$-Fragmenten, traten Bindungen an die aufgetrennten Membranproteine auf. Diese ließen sich auch nicht durch Voradsorption mit Escherichia coli-Zellen oder -Proteinen vollständig verhindern. Vermutlich hatten die Tiere, aus denen die Antikörper gewonnen worden waren, irgendwann eine Escherichia coli-Infektion durchgemacht. Deshalb waren die entsprechenden Antikörper noch im Serum.

Mit den D141-Antikörpern konnten trotzdem verstärkte Bindungen an drei Mem-

branproteine nachgewiesen werden.

Die AJ235-Antikörper zeigten eine verstärkte Bindung an die Eisenproteine und die Hauptproteine außer dem OmpA-Protein. Mit über einen Blot affinitätsgereinigten AJ235-Antikörpern konnte gezeigt werden, daß diese eine kurze Antigendeterminante, die auf den meisten der denaturierten Membranproteine vorhanden ist, erkennen.

Lane und Koprowski haben 1982 ein Modell vorgeschlagen, mit dem die Erkennung solch kurzer Antigendeterminanten durch monoklonale Antikörper erklärt werden kann (55).

Monoklonale Antikörper gegen ein Protein P erkennen auf diesem nur eine Antigendeterminante. Existiert ein Protein Q, das die gleiche Antigendeterminante hat, sich aber sonst völlig vom Protein P unterscheidet, können monoklonale Antikörper gegen diese Determinante nicht zwischen beiden Proteinen unterscheiden (Abb. 24). Ein polyklonales Serum gegen Protein P würde, da es eine Vielzahl von Antigendeterminanten erkennt, nur schwach mit dem Protein Q reagieren.

Abb. 24

Es kann aber auch Reaktionen der monoklonalen Antikörper gegen das Protein P mit einem Protein R und einem Protein S geben, die jeweils nur einen (unterschiedlichen) Teil der Antigendeterminante des Proteins P haben (Abb. 25). Das Erstaunliche ist vor allem, daß zwei Antigene (Protein R und S) mit den gleichen monoklonalen Antikörpern reagieren, obwohl sie keine gemeinsame Antigendeterminante haben.

Abb. 25

Die schwachen Reaktionen der AJ235-Antikörper mit einem Großteil der denaturierten Membranproteine sind eventuell auf die Erkennung solcher Teilbereiche der eigentlichen Antigendeterminanten zurückzuführen.

Die Funktionsfähigkeit des Blottings konnte erst nach Abschluß der eigentlichen Experimente überprüft werden. Bittner-Suermann (Mainz) stellte monoklonale Antikörper gegen das OmpA-Protein zur Verfügung. Mit diesen Antikörpern konnte im Immunoblot eine starke Anfärbung beider Formen (hitzedenatu-

riert und nicht-hitzedenaturiert) des OmpA-Proteins nachgewiesen werden. Es gab nur eine sehr schwache Anfärbung anderer Proteine (52). Die Antigendeterminanten des OmpA-Proteins bleiben, wie erwähnt, auch nach SDS-Solubilisierung weitgehend erhalten.

Das Immunoblotting war also nicht zum Screening der Hybridomalinien geeignet, da Antikörper mit einer Spezifität für native Proteine nicht nachgewiesen werden konnten.

Es stand also kein positives Selektionsverfahren zur Verfügung.

Die Antigenspezifitäten konnten nur nachgewiesen werden, indem gut funktionierende Tests (Enzymimmunassay mit Membranen oder ganzen Zellen, Agglutinationstests, Funktionstests) mit veränderter Antigenzusammensetzung durchgeführt wurden.

Man konnte für den Agglutinationstest z.B. Mutanten in einem bestimmten Protein einsetzen oder beim Enzymimmunassay mit Membranen aus definierten Mutanten beschichten. Trat bei einer solchen Veränderung eine ursprünglich positive Reaktion nicht mehr auf, konnte man auf die Antigenspezifität schließen.

Dieses Verfahren war sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Aus diesem Grund konnten nur drei von mehr als Hundert mit Escherichia coli-Membranantigenen reagierende monoklonale Antikörper in dieser Arbeit eindeutig charakterisiert werden.

Für die eigentlichen Untersuchungen der Rezeptor- und Membrantopologie stand deshalb nur etwa ein Drittel der gesamten Arbeitszeit zur Verfügung.

5. Zusammenfassung

Aus etwa dreißig Fusionen wurden drei Hybridomalinien zur näheren Charakterisierung ausgewählt.

Die Linie D141 produziert IgG_1-Antikörper, die gegen den FhuA-Rezeptor gerichtet sind.

Die Spezifität wurde durch Agglutinationstests mit Mutanten, T5-Phagenbindungstests und Colicin M-Tests nachgewiesen.

Die Linie K53 produziert IgG_1-Antikörper, die gegen das OmpA-Genprodukt gerichtet sind.

Die Spezifität wurde durch Agglutinationstests mit Mutanten, Immunpräzipitationen und durch TuII*- und K3-Phagenbindungstests nachgewiesen.

Die Linie AJ235 produziert IgG_{2b}-Antikörper, die gegen den FhuA-Rezeptor gerichtet sind. Die Antikörper wurden durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose gereinigt.

Die Spezifität wurde durch Agglutinationstests mit Mutanten, Enzymimmunassays mit ganzen Bakterien und Phagenadsorptionskinetiken nachgewiesen.

Mit Phagenadsorptionskinetiken sowie Colicin M-Tests konnte gezeigt werden, daß die AJ235-Antikörper den Teil des FhuA-Rezeptors blockieren, der für die Adsorption der Phagen T1 und T5 sowie für die Aufnahme des Colicins M benötigt wird. Die Bindung des Phagens ø80 wird nicht behindert.

Die Adsorption der Phagen T2, T6 und TuIb wird durch an den FhuA-Rezeptor gebundene Antikörper sterisch gehemmt.

Es war nicht möglich mit Hilfe des Immunoblottings die Spezifität der Antikörper zu bestimmen. Die Membranproteine müssen für die SDS-Page in SDS-Puffer solubilisiert werden. Diese SDS-denaturierten Membranproteine können von den gegen native Proteine gerichteten Antikörpern nicht erkannt werden.

6. Literatur

(1) AVRAMEAS,S (1969) Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde. Use of the Conjugates for the Detection of Antigens and Antibodies. Immunchemistry 6, 43-52

(2) BACHMANN,B J (1983) Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 7. Microbiol. Rev. 47, 180-230

(3) BAYER,M E (1968) Adsorption of Bacteriophage to Adhesions Between Wall and Membrane of Escherichia coli. J. Virol. 2, 346-356

(4) BIO RAD Product Information (1981) Trans-Blot Cell Instructions. Richmond, USA

(5) BOLTON,A E (1979) Proteinmarkierungstechniken, Review 18, Amersham Buchler, Braunschweig

(6) BOWEN,B, STEINBERG,J, LAEMMLI, U K, WEINTRAUB,H (1980) The Detection of DNA-Binding Proteins by Protein Blotting. Nucl. Acids Res. 8, 1-20

(7) BRAUN,V (1975) Covalent Lipoprotein from the Outer Membrane of Escherichia coli. Biochim Biophys. Acta 415, 335-377

(8) BRAUN,V (1983) The Iron Transport System of Escherichia coli. In: Martonosi,A N (ed.) The Enzymes of Biological Membranes, Vol. 3, Plenum Press, New York

(9) BRAUN,V, GROSS,R, KÖSTER,W, ZIMMERMANN,L (1983) Plasmid and Chromosomal Mutants in the Iron(III)-Aerobactin Transport System of Escherichia coli. Use of Streptonigrin for Selection. Mol. Gen. Genet. 192, 131-139

(10) BRAUN,V, HANTKE,K (1981) Bacterial Cell Surface Receptors. In: Ghosh,B K (ed.) Organization of the Procaryotic Cell Membrane, Vol. II, 1-74, CRC Press, Boca Raton

(11) BRAUN,V, HANTKE,K (1982) Receptor-Dependent Transport Systems in Escherichia coli for Iron Complexes and Vitamine B12. In: Martonosi, A N (ed.) Membranes and Transport, Vol. 2, 107-113, Plenum Press, New York

(12) BULLOCK,S L, WALLS,K W (1977) Evaluation of Some of the Parameters of the Enzyme-Linked Immunospecific Assay. J. Infectious Dis. 136, Supplement, S 279-285

(13) CARRASCO,N, TAHARA,S M, PATEL,L, GOLDKORN,T, KABACK,H R (1982) Preparation, Characterization, and Properties of Monoclonal Antibodies Against the Lac Carrier Protein from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6894-6898

(14) COULTON,J W (1982) The Ferrichrom-Iron Receptor of Escherichia coli K-12. Antigenicity of the FhuA-Protein. Biochim. Biophys. Acta 717, 154-162

(15) COULTON,J W, BRAUN,V (1979) Protein II* Influences Ferrichrom-Iron Transport in Escherichia coli K-12. J. Gen. Microbiol. 110, 211-220

(16) DANKERT,J, HOFSTRA,H (1978) Antibodies Against Outer Membrane Proteins in Rabbit Antisera Prepared Against Escherichia coli 026 K60. J.Gen. Microbiol. 104, 311-320

(17) DREHER,R M (1983) "Proform" und Funktions-Domänen von Colicin M. Dissertation, Universität Tübingen

(18) ENGVALL,E (1980) Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. Meth. Enzymol. 70, 419-439

(19) FAZEKAS DE ST. GROTH,S, SCHEIDEGGER,D (1980) Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics. J. Immunol. Meth. 35, 1-21

(20) FECKER,L, BRAUN,V (1983) Cloning and Expression of the fhu Genes Involved in Iron(III)-Hydroxamate Uptake of Escherichia coli. J. Bacteriol. 156 (3)

(21) FISS,E H, STANLEY-SAMUELSON,P, NEILANDS,J B (1982) Properties and Proteolysis of Ferric Enterobactin Outer Membrane Receptor in Escherichia coli K-12. Biochemistry 21, 4517-4522

(22) GABAY,J, BENSON,S, SCHWARTZ,M (1983) Genetic Mapping of Antigenic Determinants on a Membrane Protein. J. Biol. Chem. 258, 2410-2414

(23) GABAY,J, SCHWARTZ,M (1982) Monoclonal Antibody as a Probe for Structure and Function of an Escherichia coli Outer Membrane Protein. J. Biol. Chem. 257, 6627-6630

(24) GALANOS,C, LÜDERITZ,O, WESTPHAL,O (1969) A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 9, 245-249

(25) GALFRE,G, MILSTEIN,C (1981) Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. Meth. Enzymol. 73, 3-46

(26) GERSHONI,J M, PALADE,G E (1983) Protein Blotting: Principles and Applications. Anal. Biochem. 131, 1-15

(27) GODING,J W (1978) Use of Staphylococcal Protein A as an Immunological Reagent. J. Immunol. Meth. 20, 241-253

(28) GREENWOOD,F C, HUNTER,W M, GLOVER,J S (1963) The Preparation of ^{131}J-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. Biochem. J. 89, 114-123

(29) HANCOCK,R E W, persönliche Mitteilung

(30) HANCOCK,R E W, WIECZOREK,A A, MUTHARIA,L M, POOLE,K (1982) Monoclonal Antibodies Against Pseudomonas aeruginosa Outer Membrane Antigens: Isolation and Characterization. Infect. Immun. 37, 166-171

(31) HANTKE,K (1983) Identification of an Iron Uptake System Specific for Coprogen and Rhodotorulic Acid in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 191, 301-306

(32) HANTKE,K, persönliche Mitteilung

(33) HANTKE,K, BRAUN,V (1979) Functional Interaction of the tonA/tonB Receptor System in Escherichia coli. J. Bacteriol. 135, 190-197

(34) HELLER,K, BRAUN,V (1979) Accelerated Adsorption of Bacteriophage T5 to Escherichia coli F, Resulting from Reversible Tail Fiber-Lipopolysaccharide Binding. J. Bacteriol. 139, 32-38

(35) HIERNAUX,J, BONA,C A (1982) Shared Idiotypes Among Monoclonal Antibodies Specific for Different Immunodominant Sugars of Lipopolysaccharide of Different Gram-negative Bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1616-1620

(36) HOFSTRA,H, DANKERT,J (1979) Antigenic Cross-reactivity of Major Outer Membrane Proteins in Enterobacteriaceae Species. J. Gen. Microbiol. 111, 292-302

(37) HOFSTRA,H, DANKERT,J (1980) Preparation and Quantitative Determination of Antibodies Against Major Outer Membrane Proteins of Escherichia coli 026 K60. J. Gen. Microbiol. 117, 437-447

(38) HOFSTRA,H, DANKERT,J (1981) Porin from the Outer Membrane of Escherichia coli. Immunological Characterization of Native and Heat-dissociated Forms. J. Gen. Microbiol. 125, 285-292

(39) HURN,B A L, CHANTLER,S M (1980) Production of Reagent Antibodies. Meth. Enzymol. 70, 104-142

(40) ICHIHARA,S, MIZUSHIMA,S (1979) Arrangement of Protein O-8 and O-9 in Outer Membrane of Escherichia coli K-12. Existence of Homotrimers and Heterotrimers. Eur. J. Biochem. 100, 321-328

(41) ITO,K, BASSFORD,P J, BECKWITH,J (1981) Protein Localization in E. coli: Is There a Common Step in the Secretion of Periplasmic and Outer Membrane Proteins? Cell 24, 707-717

(42) IVANYI,I, persönliche Mitteilung

(43) JANSEN,F K et al. (1980) High Specific Cytotoxicity of Antibody-Toxin-Hybrid Molecules (Immunotoxins) for Target Cells. Immunol. Lett. 2, 97-102

(44) JENSENIUS,J C, WILLIAMS,A F (1974) The Binding of Anti-Immunoglobulin Antibodies to Rat Thymocytes of Thoratic Duct Lymphocytes. Eur. J. Immunol. 4, 91-97

(45) JOHNSTONE,A, THORPE,R (1982) Immunchemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications, Oxford

(46) KASS,E H, WOLFF,S M (1973) Bacterial Lipopolysaccharides. The University of Chicago Press, Chicago

(47) KIMURA,K, MASON,T L, KHORANA,H G (1982) Immunological Probes for Bacteriorhodopsin. Identification of Three Distinct Antigenic Sites on the Cytoplasmic Surface. J. Biol. Chem. 257, 2859-2867

(48) KNUTTON,S, PASTERNAK,C A (1979) The Mechanism of Cell-Cell Fusion. Trends Biochem. Sci. 4, 220-223

(49) KÖHLER,G (1978) Protokoll des EMBO LABORATORY COURSE ON B-LYMPHOCYTE FUSION. Basel Institute for Immunology

(50) KÖHLER,G (1979) Soft Agar Cloning of Lymphoid Tumor Lines. Detection of Hybrid Clones with the Anti-SRBC-Activity. In: Lefkovits,J, Pernis,B (eds.) Immunological Methods, 397-401, Academic Press, New York

(51) KÖHLER,G, MILSTEIN,C (1975) Continuos Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity. Nature 256, 495-497

(52) KOMISCHKE,K, unveröffentlichte Ergebnisse

(53) KRIEGER-BRAUER,H J, BRAUN,V (1980) Functions Related to the Receptor Protein Specified by the tsx-Gene of Escherichia coli. Arch. Microbiol. 124, 233-242

(54) LAEMMLI,U K (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

(55) LANE,D, KOPROWSKI,H (1982) Molecular Recognition and the Future of Monoclonal Antibodies. Nature 296, 200-202

(56) LERNHARDT,W, ANDERSSON,J, COUTINHO,A, MELCHERS,F (1978) Cloning of Murine Transformed Cell Lines in Suspension Cultures with Efficiencies near 100%. Exp. Cell Res. 111, 309-316

(57) LINDLEY,M (1980) Adhesion of Pathogenic Microorganism. Nature 286, 556-557

(58) LITTLEFIELD,J W (1964) Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. Science 145, 709-710

(59) LUGTENBERG,B, MEIJERS,J, PETERS,R, VAN DER HOEK,P, VAN ALPHEN,L (1975) Electrophoretic Resolution of the "Major Outer Membrane Protein" of Escherichia coli K-12 into Four Bands. FEBS Lett. 58, 254-258

(60) LUGTENBERG,B, VAN ALPHEN,L (1983) Molecular Architectur and Functioning of the Outer Membrane of Escherichia coli and Other Gram-negative Bacteria. Biochim. Biophys. Acta 737, 51-115

(61) MAGE,M G (1980) Preparation of Fab-Fragments from IgGs of Different Animal Species. Meth. Enzymol. 70, 142-150

(62) MARTINIS,J, KULL,J F, FRANZ,G, BARTHOLOMEW,R M (1982) Monoclonal Antibodies with Dual Antigen Specificity. In: Peeters,H (ed.) Protides of the Biological Fluids, Vol. 30, 311-316, Pergamon Press, Oxford

(63) MAURER,P H, CALLAHAN,H J (1980) Proteins and Polypeptides as Antigens. Meth. Enzymol. 70, 49-69

(64) McCORQUODALE,D J (1975) The T-odd Bacteriophages. Crit. Rev. Microbiol. 4, 101-159

(65) McKEARN,T J (1980) Cloning of Hybridoma Cells by Limiting Dilution in Fluid Phase. In: Kennett,R H, McKearn,T J, Bechtol,K B (eds.) Monoclonal Antibodies, 374, Plenum Press, New York

(66) MIZUNO,T, CHOU,M-Y, INOUYE,M (1983) A Comparative Study on the Genes for Three Porins of the Escherichia coli Outer Membrane. DNA-Sequence of the Osmoregulated ompC Gene. J. Biol. Chem. 258, 6932-6940

(67) NACHAMKIN,J, CANNON,J G, MITTLER,R S (1981) Monoclonal Antibodies Against Neisseria gonorrhoeae: Production of Antibodies Directed Against a Strain-specific Cell Surface Antigen. Infect. Immun. 32, 641-648

(68) NEIDHARDT,F C, VAUGHN,V, PHILLIPS,T A, BLOCH,P L (1983) Gene-Protein Index of Escherichia coli K-12. Microbiol. Rev. 47, 231-284

(69) NEILANDS,J B (1982) Microbial Envelope Proteins Related to Iron. Ann. Rev. Microbiol. 36, 285-309

(70) NIKAIDO,H, NAKAE,T (1979) The Outer Membrane of Gram-negative Bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 20, 163-250

(71) OLMSTEDT,J B (1981) Affinity Purification of Antibodies from Diazotized Paper Blots of Heterogeneous Protein Samples. J. Biol. Chem. 256, 11955-11957

(72) RANDALL-HAZELBAUER,L, SCHWARTZ,M (1973) Isolation of the Bacteriophage Lambda Receptor from Escherichia coli. J. Bacteriol. 116, 1436-1446

(73) ROTMAN,B, PAPERMASTER,B W (1966) Membrane Properties of Living Mammalian Cells as Studied by Enzymatic Hydrolysis of Fluorogenic Esters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 134-141

(74) SCHENKMANN,S, CONTURE,E, SCHWARTZ,M (1983) Monoclonal Antibodies Antibodies Reveal LamB Antigenic Determinants of Both Faces of the Escherichia coli Outer Membrane. J. Bacteriol. 155, 1382-1392

(75) SCHNAITMAN,C A (1971) Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of Escherichia coli by Triton X-100. J. Bacteriol. 108, 545-552

(76) SLUYTERMAN,L A AE (1967) The Activation Reaction of Papain. Biochim. Biophys. Acta 139, 430-438

(77) SOUTHERN,E M (1975) Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

(78) STOCK,J B, RAUCH,B, ROSEMAN,S (1977) Periplasmic Space in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. J. Biol. Chem. 252, 7850-7861

(79) TOWBIN,H, STAEHELIN,T, GORDON,J (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamid Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

(80) UDENFRIED,S, STEIN,S, BÖHLEN,P, DAIRMAN,W, LEIMGRUBER,W, WEIGELE, M (1972) Fluorescamin: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amins in the Picomole Range. Science 178, 871-872

(81) VALENTINE,R C, GREEN,N M (1967) Electron Microscopy of an Antibody-Hapten Complex. J. Mol. Biol. 27, 615-617

(82) VAN ALPHEN,L, HAVEKES,L, LUGTENBERG,B (1977) Major Outer Membrane Protein d of Escherichia coli K-12. Purification and in vitro Activity of Bacteriophage K3 and F-Pilus Mediated Conjugation. FEBS Lett. 75, 285-290

(83) VAN VUNAKIS,H (1980) Radioimmunoassays: An Overview. Meth. Enzymol. 70, 201-209

(84) VOLLER,A, BIDWELL,D, BARTLETT,A (1976) Microplate Enzyme Immunoassay for the Immundiagnosis of Virus Infections. In: Rose,N R, Friedman,M (eds.) Manual of Clinical Immunology, 506-512, American Society for Microbiology, Washington,D C

(85) WAGEGG,W, BRAUN,V (1981) Ferric Citrate Transport in Escherichia coli Requires Membrane Receptor Protein FecA. J. Bacteriol. 145, 156-163

(86) WAYNE,R, NEILANDS,J B (1975) Evidence of Common Binding Sites for Ferrichrom Compounds and Bacteriophage ϕ80 in the Cell Envelope of Escherichia coli. J. Bacteriol. 121, 497-503

(87) YELTON,D E, SCHARFF,M D (1981) Monoclonal Antibodies: A Powerful New Tool in Biology and Medicine. Ann. Rev. Biochem. 50, 657-680

Lebenslauf

Klemens Komischke

geboren am 16. Januar 1954
in Berlin - Spandau

1960 - 1966	Besuch der Zeppelin-Grundschule in Berlin - Staaken
1966 - 1973	Besuch der Freiherr-vom-Stein-Oberschule in Berlin - Spandau
April 1973	Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Tübingen
März 1974	Erster Teil der Diplom-Vorprüfung
September 1976	Zweiter Teil der Diplom-Vorprüfung
Mai 1979	Mündliche Diplom-Hauptprüfung in Biochemie, Organischer Chemie und Mikrobiologie
September 1979 - Juni 1980	Anfertigung der Diplomarbeit
2. Juli 1980	Diplomzeugnis
August 1980 - Dezember 1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Professor Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, W. Bessler, V. Braun, W. Braun, K.G. Grell, J. Guglielmi, H. Hagenmaier, K. Hantke, P. Hausen, H. Krüger, H. Mauser, D. Mecke, H. Metzner, K. Mörike, E. Müller, H. Ninnemann, P. Overath, H. Probst, W. Rüdorff, B. Schwemmle, K. Wegmann, G. Weitzel, U. Weser, H. Wolf, H. Zähner